

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

Novos Fármacos no Sarcoma de Ewing

Trabalho Final do Mestrado Integrado em Medicina

Raquel Lopes Brás

Orientadora: Dra. Isabel Cristina Fernandes

Clínica Universitária de Oncologia Médica

2015-2016

Resumo

Os doentes com Sarcoma de Ewing (EWS), neoplasia maligna mesenquimatosa caracterizada pela translocação específica t(11;22) e pela proteína de fusão EWSR1-FLI1, não têm tido um aumento muito significativo da sua sobrevivência nos últimos anos apesar dos avanços científicos. A terapêutica consiste na cirurgia e/ou radioterapia, sendo sempre recomendada quimioterapia antes e após as técnicas de controlo local. A escolha do tratamento local depende da possibilidade de excisão com margens seguras, da potencial perda funcional e do tamanho tumoral, entre outros fatores.

Neste estudo pretende-se fazer uma revisão da literatura sobre este subtipo de sarcoma, dando particular relevo à quimioterapia e novas terapêuticas-alvo. Os esquemas de quimioterapia têm vindo a ser alterados ao longo dos anos, de acordo com os resultados dos ensaios clínicos. Atualmente, os principais esquemas utilizam vincristina, ifosfamida, doxorubicina, etoposido, dactinomicina e ciclofosfamida, em combinações e sequências diferentes. A investigação da biologia molecular e celular do EWS levou à descoberta de potenciais alvos terapêuticos. Vários fármacos dirigidos a estes alvos estão a ser investigados, alguns já em ensaios clínicos, outros apenas com estudos pré-clínicos realizados. Está também a ser pesquisada a presença de biomarcadores que permitam prever a resposta terapêutica. Alguns destes fármacos, como por exemplo, os fármacos anti-IGF-1R, têm mostrados resultados muito promissores, mas aguardam-se mais estudos.

Abstract

Ewing sarcoma (EWS) is a mesenchymatous malignant neoplasm characterized by the specific translocation t(11;22) and by the fusion protein EWSR1-FLI1. Patients with EWS have not had a significant increase in their overall survival in these last years, despite increasing investigation. Treatment is based on chemotherapy before and after local control approaches, that is, surgery and/or radiotherapy. The choice of the most appropriate local treatment depends on the tumor size, the probability to obtain negative margins and the potential functional loss, among other factors.

This study intends to review the literature on this subtype of sarcoma, with particular regard to chemotherapy and targeted therapies. The chemotherapy regimens have changed over the years, following the results of clinical trials. Currently, the main chemotherapy regimens use vincristine, ifosfamide, doxorubicin, etoposide, cyclophosphamide, and dactinomycin, in different combinations and sequences. Basic research on the molecular and cellular biology of EWS has led to the discovery of potential therapeutic targets. Several drugs directed at these targets are currently under investigation. While some of them are already being tested in clinical trials, others have only now completed preclinical studies. Several potential biomarkers are also being evaluated to predict response to therapy. Some of these drugs, such as anti-IGF-1R drugs have shown promising results, but further studies are still needed.

Sarcoma de Ewing

Introdução

O Sarcoma de Ewing (EWS) é uma neoplasia mesenquimatosa maligna de alto grau, composta por células pequenas, redondas e azuis, CD 99 positivas e com alterações moleculares específicas. Em aproximadamente 85% dos casos, há uma translocação específica que leva à fusão do gene EWSR1 (22q12) com o gene FLI1 (11q24), ou na maioria dos restantes casos, com um membro da família de fatores de transcrição ETS, para além do FLI1. Foi descrito pela primeira vez por James Ewing, em 1921. ^[1-5]

Este trabalho tem como objetivo geral rever o tratamento do sarcoma de Ewing, com principal enfoque nos novos fármacos que foram aprovados nos últimos anos ou que ainda estão em estudo. Os objetivos específicos são:

1. Revisão de alguns dos conceitos teóricos relativos ao sarcoma de Ewing, nomeadamente a sua definição, epidemiologia, apresentação clínica, laboratorial e imagiológica, fatores prognósticos, histologia, biologia molecular e genética e estadiamento.
2. Rever historicamente a evolução do tratamento do sarcoma de Ewing ao longo das últimas décadas e analisar o estado da arte atual neste tópico, de acordo com a evidência científica.
3. Analisar a evidência científica sobre novos fármacos que tenham sido estudados e/ou aprovados nos últimos anos ou que ainda estejam em estudo.

Os sarcomas, e principalmente os sarcomas ósseos, são tumores raros na população em geral. No entanto, este tema assume-se como de especial importância, pois neste grupo de tumores, o Sarcoma de Ewing é um tumor muito frequente, ocorrendo principalmente em idade pediátrica em que a potencial perda de anos de vida saudáveis é muito elevada. Além disso, é diagnosticado em fase avançada, com metastização à distância, numa percentagem significativa dos doentes (25%) e apenas nos últimos 5-10 anos se tem começado a estudar e investigar novas terapêuticas dirigidas em ensaios clínicos, em doentes com doença avançada. Assim, torna-se essencial uma revisão bibliográfica dos estudos realizados e a decorrer.

Epidemiologia

É o terceiro tumor primário do osso mais frequente, a seguir ao osteossarcoma e ao condrossarcoma, o segundo mais frequente em idade pediátrica (menores de 20 anos) e o primeiro abaixo dos 10 anos de idade. De facto, é mais frequente no grupo etário pediátrico e muito incomum acima dos 30 anos. Na idade adulta, embora menos frequente, é mais comum o envolvimento de tecidos moles e de órgãos. Nos Estados Unidos da América, a incidência no grupo etário dos 10-19 anos é 9-10 vezes superior à incidência global. A idade mediana de aparecimento do EWS é aos 15 anos, com o pico entre os 10 e os 24 anos. [1-4, 6-10]

É mais comum em Caucasianos e doentes do sexo masculino (rácio 3:2). É mais raro em populações Africanas e com incidência intermédia nos Asiáticos. Pensa-se que este facto esteja relacionado com um polimorfismo específico no gene EGR2 no cromossoma 10q21.3, que está associado a um risco aumentado de EWS, que coopera com o produto de fusão do gene EWSR1-FL11, presente na maioria dos doentes com EWS. Este polimorfismo é muito mais frequente em pessoas caucasianas. [1, 7, 8, 11, 12]

A incidência ao longo das três últimas décadas tem-se mantido estável, tendo, no entanto, havido melhorias significativas na sobrevivência. A sobrevida aos 10 anos passou de 39% para 63% para doença localizada e de 16% para 32% para doença metastizada. Entre 1975 e 2010, a sobrevida a 5 anos subiu de 59% para 78% em crianças menores de 15 anos e de 20% para 60%, em adolescentes entre os 15 e os 19 anos. No entanto, ao longo dos últimos 10 anos, a sobrevida estagnou. [7, 13-15]

A mediana de tempo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico é longo e situa-se entre os dois e os cinco meses. Intervalos maiores associam-se com idades mais avançadas e local primário na pélvis. Não está associado com metástases, resultados cirúrgicos nem sobrevida. Cerca de 25% dos doentes com EWS têm metástases no momento do diagnóstico. Os pulmões são o local mais comum de metastização à distância (50%), seguidos pelo osso (25%) e pela medula óssea (20%). [7, 14, 16-18]

Clínica

Os locais primários do EWS ósseo são as extremidades inferiores (41%), pélvis (26%), parede torácica (16%), extremidade superior (9%), coluna vertebral (6%), mão e pé (3%) e

crânio (2%). Nos ossos longos, estão classicamente localizados na diáfise mas também podem ser metafisários, na porção metafisária-diafisária ou epifisários. [7, 19, 20]

Nos EWS extra-ósseos, os locais primários mais comuns são o tronco (32%), as extremidades (26%), cabeça e pescoço (18%) e retroperitoneu (16%). [7]

Os doentes com EWS apresentam sintomas locais como aparecimento de massa (61%), dor intensa, que acorda o doente, (96%), edema, dilatação venosa e hiperemia. Muitas vezes, a dor localizada precede por vários meses o aparecimento de massa visível. Raramente, pode haver fraturas patológicas (16%, no momento do diagnóstico) por metástases ósseas. Dor associada a metástases na coluna vertebral pode progredir para paralisia. Podem também aparecer sintomas neurológicos, por, por exemplo, compressão do plexo lombo-sagrado. Febre intermitente (21%) também pode ocorrer. No caso de EWS da parede torácica, pode ocorrer derrame pleural associado a pleurisia carcinomatosa. [1, 17, 19-21]

A nível laboratorial é comum encontrar-se anemia e leucocitose, aumento da velocidade de sedimentação, da lactato desidrogenase (LDH), da fosfatase alcalina e da proteína C reativa. Leucocitose e LDH elevada correlacionam-se com pior prognóstico. [1, 19, 22-24]

A nível radiológico, no EWS ósseo, a radiografia simples mostra destruição difusa e infiltrativa do osso afetado, mais frequentemente na diáfise, revelando a natureza agressiva do tumor. Pode também observar-se osteólise, destruição cortical, reação periosteal multilamelar (ou em casca de cebola) ou com espículas (em raios de sol) e uma massa de tecidos moles, com margens mal definidas e sem calcificação. A tomografia computadorizada (TC) pode ser útil para massas de tecidos moles extra-esqueleto, destruição do córtex ósseo e para metástases pulmonares. A ressonância magnética nuclear (RMN) é o melhor método para o estadiamento de doença local e regional pois revela a extensão do envolvimento intraósseo e de tecidos moles (medula óssea, vascular e nervoso). Na RMN, o EWS ósseo apresenta-se com sinal hipo-intenso em imagens ponderadas em T1 e com sinal híper-intenso em imagens ponderadas em T2, e aparece como enormes massas de tecidos moles derivadas do osso. Lesões multifocais e descontínuas podem também ser vistas na RMN. Na cintigrafia óssea, há elevada captação de ^{99m}Tc-MDP, à semelhança do que acontece à captação de ¹⁸F-fluorodesoxiglucose (¹⁸F-FDG). Do ponto de vista radiológico, o diagnóstico diferencial do EWS inclui osteomielite, histiocitose de células de Langerhans, neuroblastoma metastático do esqueleto e linfoma ósseo maligno. [1, 19-21]

Fatores prognósticos

- **Local do tumor:** EWS nas extremidades distais têm melhor prognóstico, nas extremidades proximais têm diagnóstico intermédio, tendo pior prognóstico se for central ou pélvico. No grupo dos EWS pélvicos, os tumores localizados no sacro têm melhor prognóstico do que nos ossos ilíacos. [7, 25-28]
- **Tamanho/Volume tumoral:** é um importante fator prognóstico. Um volume superior a 100-200 ml e/ou a maior dimensão superior a 8 cm definem tumores grandes, que para além de se correlacionarem com pior prognóstico também tendem a ocorrer em locais menos favoráveis. [7, 27, 29]
- **Idade:** crianças com menos de 15 anos tendem a ter melhor prognóstico do que crianças com idade igual ou superior. Nos adultos, o prognóstico é pior que no grupo pediátrico e é melhor em idades inferiores a 40 anos. [7, 10, 25, 26, 30-33]
- **Género:** os doentes do género feminino têm melhor prognóstico. [7, 8, 26]
- **Etnia:** Nos Estados Unidos da América, doentes de origem europeia tendem a ter melhor prognóstico do que doentes de origem africana, asiática ou hispânica. [11]
- **LDH sérica:** níveis aumentados de LDH sérica antes do início do tratamento estão associados com pior prognóstico, tumores maiores e doença metastática. [1, 7, 26]
- **Leucócitos:** a presença de leucocitose correlaciona-se com pior prognóstico. [22-24]
- **Metástases:** metástases encontradas por técnicas de imagem ou por biopsia/citologia aspirativa da medula óssea correlacionam-se com pior prognóstico. A presença ou ausência de metástases é o fator preditivo mais forte em relação ao prognóstico. Doentes com doença metastática confinada ao pulmão têm melhor prognóstico do que doentes com doença metastática extrapulmonar. O número de lesões não se correlaciona com o prognóstico mas doentes com envolvimento pulmonar unilateral têm melhores resultados do que se houver envolvimento pulmonar bilateral. Doentes com metástases exclusivamente ósseas têm melhor prognóstico do que se tiverem metástases ósseas e pulmonares. O envolvimento de gânglios linfáticos regionais é um fator independente de prognóstico adverso. [7, 25, 27, 34-38]
- **Tratamento antineoplásico prévio:** os doentes com EWS que tivessem tido outra neoplasia no passado são mais velhos e têm maior probabilidade de ter o EWS primário no esqueleto axial ou extra-esquelético, o que piora o prognóstico. No entanto, apesar de terem menor sobrevida, têm menor probabilidade de morrer devido ao EWS. [7, 39]
- **Citogenética:** um cariótipo complexo e um número modal de cromossomas inferior a 50 correlaciona-se com pior prognóstico. [7, 40]

- **Transcritos de fusão** detetados em **medula óssea morfológicamente normal**: associados a maior risco de recaída. [7, 41]
- **Monocitose** no sangue periférico: correlaciona-se com pior prognóstico. [42]
- **Outros fatores biológicos**: sobre-expressão da proteína p53, expressão de Ki67 e perda de 16q podem ser fatores prognósticos adversos. Elevada expressão de glutathione S-transferase microssomal, enzima associada a resistência à doxorubicina, está associada a pior prognóstico. [7, 43-46]
- **Expressão imunohistoquímica de Akt**: está associado a pior prognóstico global e pior sobrevida livre de doença ($p < 0.05$). [47]

Não são fatores associados a pior prognóstico:

- Fraturas patológicas [7, 48]
- Histopatologia: grau de diferenciação neural [7, 49, 50]
- Patologia molecular: a translocação EWSR1-ETS associada ao EWS pode ocorrer em vários potenciais locais de corte, em cada um dos genes que se juntam para formar o novo segmento de ADN; no entanto estes locais de corte não estão associados a prognósticos diferentes. [7, 51-53]
- A expressão imunohistoquímica de Yap, mTOR e da proteína Erk não está associada ao prognóstico. [47]

Doentes com tumor viável mínimo ou sem tumor viável residual após quimioterapia (QT) pré-cirúrgica têm melhor sobrevida livre de eventos. Género feminino e idades mais jovens associam-se com melhor resposta histológica ao tratamento pré-operatório. Em doentes que fazem tomografia por emissão de positrões (PET) pré- e pós-QT de indução, a captação diminuída após quimioterapia correlaciona-se com boa resposta histológica e melhor prognóstico. Doentes com má resposta histológica à QT pré-cirúrgica (QT de indução) têm risco aumentado de recorrência local, sendo a resposta histológica também um fator de prognóstico. [7, 19, 54-61]

Histologia

O EWS é composto por lâminas de células pequenas, redondas e azuis, uniformes, com núcleo redondo, de cromatina dispersa e sem nucléolo, e escasso citoplasma, livre e com glicogénio, o que o torna reativo a ácido periódico-Schiff (PAS). As células estão densamente dispostas e crescem num padrão difuso sem organização estrutural nem formação de matriz extracelular. Apresentam raras mitoses. Pode também observar-se características morfológicas indicativas de diferenciação neuronal, tal como a formação de rosetas. Existe um espectro contínuo de diferenciação neuronal que pode ser observado nestes tumores com a translocação específica EWSR1-FLI1. [1, 7]

Em relação à imunohistoquímica, estes tumores são, por vezes, positivos para marcadores neurais, tais como a proteína S-100, a enolase específica neural NSE, a sinaptofisina, o CD57 e a PGP9.5, e para a vimentina. O CD99, produto do gene MIC2, é uma proteína da superfície de membrana que é expressa em mais de 90% dos casos de EWS. No entanto, positividade para CD99 não é exclusiva nem específica de EWS, sendo encontrada em outros tumores, tais como sarcoma sinovial, leucemia linfoblástica, linfoma não-Hodgkin, GIST, entre outros. Existem também outras variantes de EWS, com células grandes, com células em fuso e com células tipo adamantinoma. [1, 7, 49, 62-67]

Devido à baixa especificidade destes marcadores, é necessário recorrer à genética molecular para estabelecer o diagnóstico definitivo. [67]

Biologia

Atualmente, ainda não se definiu com exatidão a origem celular do EWS, uma vez que, o ambiente celular pode alterar os efeitos de expressão e diferenciação que o gene de fusão EWS-FLI1 provoca, dificultando esta tarefa. Anteriormente, pensava-se que teria origem em células neuroectodérmicas primitivas ou da crista neural, pois tanto os EWS como os tumores primitivos neuroectodérmicos (PNET) partilham a translocação t(11;22)(q24;q12). No entanto, o gene de fusão EWS-FLI1 também induz diferenciação neural, pelo que as características neuroectodérmicas do EWS podem advir apenas deste facto. Mais recentemente, as células estaminais mesenquimatosas (MSC) têm sido apontadas como a hipótese mais provável para a origem do EWS, pois derivam da medula óssea e a maior parte dos EWS ocorrem no osso. Estudos em células murinas mostraram que o gene EWS-FLI1 tem potencial para transformar

MSC em tumores tipo EWS e que os genes EWS-FLI1 e EWS-ERG podem bloquear a diferenciação das MSC. Em células humanas de EWS, mostrou-se que a inibição do gene EWS-FLI1 leva a um perfil de expressão génica semelhante ao das MSC. Além disso, as linhagens celulares de EWS podem diferenciar-se em linhagens osteogénicas com inibição do gene EWS-FLI1. No entanto, MSC humanas infectadas com um retrovírus que continha o EWS-FLI1 não se desenvolveram em hospedeiros ratinhos. Assim, este gene de fusão não parece ser condição suficiente para causar transformação celular e crescimento tumoral, necessitando de outras mutações específicas pré-existentes. Um estudo recente mostrou que o gene EWS-FLI1 levou a alterações da expressão génica em células embrionárias estaminais e em células neuromesenquimatosas estaminais humanas. [68-80]

Caracterização genética e molecular

O EWS caracteriza-se por apresentar uma translocação cromossômica oncogénica em 85-95% dos casos. Conforme descrito acima, mais de 85% dos EWS apresentam uma translocação equilibrada específica t(11;22)(q24;q12), que leva à fusão EWS-FLI1. A segunda translocação equilibrada mais comum é t(21;22)(q22;q12) que leva ao gene de fusão EWS-ERG e nos restantes casos, há uma translocação entre o gene EWS e outro membro da família de fatores de transcrição ETS. [1, 5, 42, 81, 82]

O gene EWS (ou EWSR1 - *Ewing sarcoma breakpoint region 1*) pertence à família TET (TLS/EWS/TAF15) de proteínas que se ligam a ARN e codifica uma proteína multifuncional envolvida na regulação da transcrição ADN-dependente. O gene FLI1 (*Friend leukemia virus integration 1*, também chamado EWSR2) e o gene ERG (*ETS-related gene*) são membros próximos da família de fatores de transcrição ETS com domínio que se liga a ADN. O gene FLI1 é expresso nas células hematopoiéticas e endoteliais e no mesênquima derivado das células da crista neural. [7, 42, 68, 83]

A fusão do segmento 5' do gene EWS, preservando o terminal N (amino-terminal), com o segmento 3' (carboxi-terminal) do gene FLI1, preservando o domínio ETS, leva à produção da proteína de fusão oncogénica EWS-FLI1 que altera a expressão de múltiplos genes-alvo, pois funciona como um ativador de transcrição aberrante. Existem variantes do tipo de fusão, mas a mais frequente é do exão 7 do EWS com o exão 6 do FLI1 (tipo 1), o exão 5 do FLI1 (tipo 2) ou o exão 9 do ERG. Múltiplas variantes do gene de fusão EWS-FLI1 podem ser expressas no

mesmo tumor. O subtipo de fusão não afeta o prognóstico, conforme referido acima. [42, 52, 53, 68, 81, 83-86]

O diagnóstico molecular do EWS contempla as técnicas de RT-PCR (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction*) e hibridação por fluorescência *in situ* (FISH). [42]

Alguns estudos mostram a presença de células tumorais circulantes com os transcritos de fusão EWS-FLI1/ERG no sangue periférico de doentes com EWS no momento do diagnóstico, mas o significado prognóstico ainda é discutível. [42, 87, 88]

Outras alterações numéricas e estruturais também podem ser observadas no EWS, tais como, ganho de cromossomas 2, 5, 8, 9, 12 e 15, translocação não recíproca t(1;16)(q12;q11.2) e deleções do braço curto do cromossoma 6. Trissomia 20 pode estar associada a um subtipo mais agressivo de EWS. [7, 40]

Uma vez que o tipo de fusão não parece afetar o prognóstico, têm-se feito vários estudos utilizando tecnologia por *microarray* para tentar identificar outras alterações genéticas que possam ter valor prognóstico. Alguns genes e vias de sinalização foram já identificados como preditores de agressividade da doença, tais como a sinalização Wnt, TP53, vias cinase PI3 e outros genes envolvidos em adesão celular, regulação da transcrição e controlo do ciclo celular. Mais especificamente, a sobre-expressão de CDH11 e de MTA1 e a subregulação de CDH2 estão associadas a pior prognóstico. A expressão elevada de CCND1 e de STEAP1 no tumor e na medula óssea de doentes com EWS correlaciona-se com pior sobrevida e no caso de CND1 com maior probabilidade de doença metastática. Também a sobre-expressão de CDT2 é um recente biomarcador de mau prognóstico, que poderá ter relevância como alvo terapêutico. Mutações no STAG2 (membro de um complexo de coesinas), encontradas em 15-20% dos casos, estão associadas a doença em estado avançado. [7, 42, 89-95]

Outro marcador que poderá ter relevância diagnóstica e prognóstica e que poderá ter interesse como potencial alvo terapêutico é a ciclina D1, que tem elevada expressão no EWS, em contraste com a baixa expressão em tecidos adultos e fetais normais; no entanto, mais estudos são necessários. [96]

Estadiamento

O estadiamento dos sarcomas de Ewing é estabelecido através da classificação TNM para sarcomas ósseos. [20]

T – Tumor primário		
TX	O tumor primário não pode ser avaliado.	
T0	Sem evidência de tumor primário.	
T1	Tumor com eixo de maior dimensão até 8 cm.	
T2	Tumor com eixo de maior dimensão superior a 8 cm.	
T3	Tumores descontínuos no local ósseo primário.	
N – Gânglios linfáticos regionais		
NX	Os gânglios linfáticos regionais não puderam ser avaliados.	
N0	Sem metástases em gânglios linfáticos regionais.	
N1	Metástases nos gânglios linfáticos regionais.	
M – Metástases à distância		
M0	Sem metástases à distância.	
M1	Metástases à distância.	
	M1a	Pulmão
	M1b	Outros locais à distância.
G – Grau histopatológico		
Se o grau não puder ser avaliado, classificar como alto grau.		
Tabela de conversão entre os sistemas de 2 graus (TNM), 3 graus e 4 graus.		
TNM - Sistema de 2 graus	Sistema de 3 graus	Sistema de 4 graus
Baixo grau	Grau I	Grau I
		Grau II
Alto grau	Grau II	Grau III
	Grau III	Grau IV

Tabela 1 - Classificação TNM dos sarcomas ósseos. Adaptado de [20] Fletcher, C.D.M. *et al.*, *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. 4th ed. WHO Classification of Tumours. Vol. 5. 2013.

Estadio	T	N	M	Grau
IA	T1	N0	M0	Baixo grau
IB	T2-3	N0	M0	Baixo grau
IIA	T1	N0	M0	Alto grau
IIB	T2	N0	M0	Alto grau
III	T3	N0	M0	Alto grau
IVA	Qualquer T	N0	M1a	Qualquer grau
IVB	Qualquer T	N1	Qualquer M	Qualquer grau
	Qualquer T	Qualquer N	M1b	Qualquer grau

Tabela 2 - Grupos de Estadiamento. Classificação TNM dos sarcomas ósseos. Adaptado de [20] Fletcher, C.D.M. *et al.*, *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. 4th ed. WHO Classification of Tumours. Vol. 5. 2013.

Tratamento

Até à década de 1960, o tratamento do EWS era apenas local, através de radioterapia e cirurgia. A partir dessa altura, deu-se a introdução de esquemas de quimioterapia, que incluíam vincristina (alcaloide), dactinomicina (antibiótico antitumoral), daunomicina (antraciclina) ou ciclofosfamida (agente alquilante), os quais aumentaram a sobrevivência destes doentes. Nas duas décadas seguintes, etoposido (inibidor da topoisomerase II) e ifosfamida (alquilante) revelam-se como fármacos com elevada eficácia como agentes únicos. A partir dos anos 80, estudos mostraram a eficácia superior destes dois fármacos, se combinados. No início do século XXI, ensaios clínicos demonstraram que quimioterapia com 5 fármacos era mais eficaz do que com 3 e que em ciclos de 2 semanas também teria maior eficácia do que em ciclos de 3 semanas. O tratamento do EWS contempla tratamento local com cirurgia e/ou radioterapia e tratamento sistémico com quimioterapia. Na década de 1960, a sobrevida a 5 anos do EWS era de 10%, sendo atualmente cerca de 60%. [1, 31, 33, 97-103]

O tratamento, além de poder ser local ou sistémico, também tem de ser adequado ao objetivo que se pretende, por exemplo, curativo ou paliativo, e adaptado ao doente e ao seu contexto bio-psico-social. A estratégia terapêutica está assim, também dependente do estadio da doença: localizada, metastática ou recorrente. Deste modo, a escolha do tratamento e o acompanhamento do doente deve ser feita por uma equipa multidisciplinar composta tanto por médicos especialistas em Oncologia, Radioterapia, Cirurgia, Ortopedia, Anatomia Patológica, Imagiologia, Medicina Nuclear, entre outras, assim como por enfermeiros, psicólogos, fisioterapeutas e assistentes sociais.

Perante os achados clínicos e a suspeita de tumor ósseo, estudos de imagem devem ser feitos para estadiamento e para planear a estratégia terapêutica, antes da realização de biópsia. A biópsia deve ser obtida dos tecidos moles sempre que possível para tentar diminuir o risco de fratura no osso afetado. A decisão do local da biópsia deve ser multidisciplinar, incluindo tanto o oncologista, como o cirurgião/ortopedista, patologista e imagiologista. A obtenção de tecido fresco permite estudos citogenéticos e de patologia molecular. Também pode ser feita, em segunda linha, uma biópsia por agulha, desde que seja obtido tecido para estes estudos. [7]

Terapêutica local: Radioterapia e Excisão Cirúrgica

O tratamento local pode ser radioterapia, excisão cirúrgica ou uma combinação de ambas. O tipo de tratamento deve atingir um equilíbrio entre a máxima agressividade terapêutica e a mínima morbilidade. A excisão cirúrgica é tipo de tratamento para controlo local mais utilizado. Apesar de estes tumores serem radiosensíveis e de a radioterapia ter sido durante anos o tratamento local de eleição, o avanço tecnológico e das técnicas cirúrgicas tem dado mais relevância à cirurgia, para além de que existe uma taxa considerável de neoplasias malignas secundárias e de recidivas locais após radioterapia. No entanto, a radioterapia é um método alternativo eficaz quando a morbilidade expectável da cirurgia é demasiado elevada. Por outro lado, no esqueleto imaturo, a radioterapia pode ter efeitos adversos muito mais marcados e provocar deformidades e morbilidade superior à da cirurgia. [1, 7, 104, 105]

A radioterapia é utilizada em doses entre 36-60 Gy, sendo geralmente em doses fracionadas totalizando aproximadamente 55,8 Gy. A dose da radioterapia está relacionada com a probabilidade de neoplasia secundária. Doentes que receberam uma dose total superior a 60 Gy têm uma probabilidade de 20%, entre 48 a 60 Gy, de 5% e menor que 48% não desenvolveram neoplasia secundária. Estudos comparando radioterapia de prótons com radioterapia de intensidade modulada (IMRT) mostraram superioridade da primeira, por poupar mais tecido normal. Os ensaios clínicos estão em curso e ainda não estão disponíveis resultados sobre os efeitos a longo prazo. Até à data, a IMRT mostrou ser melhor tolerada pelos doentes e ter menos efeitos adversos, sendo recomendada especialmente em localizações orbitais, parameníngeas, para-espinais e pélvica. [7, 105, 106]

A radioterapia pode ser utilizada em duas modalidades: [1]

- como **radioterapia definitiva**, que visa destruir a totalidade das células tumorais viáveis e que é usada para tratar lesões do esqueleto axial, como na coluna vertebral; [1]

- como **radioterapia pré- ou pós-cirúrgica** (neoadjuvante ou adjuvante), em casos em que o risco de recidiva local é considerado elevado, por, por exemplo, as margens cirúrgicas terem sido ou se esperar virem a ser insuficientes. A radioterapia adjuvante pode ser utilizada em doentes com doença residual microscópica, margens positivas ou insuficientes. A radioterapia neoadjuvante pode ser utilizada quando na avaliação pré-operatória, se prevê uma elevada probabilidade de as margens virem a ser positivas ou insuficientes. [1, 7, 107]

Atualmente, é administrada quimioterapia neoadjuvante para reduzir o volume tumoral e permitir a excisão cirúrgica com margens negativas ou com menor morbidade para o doente, reduzindo assim o número de casos em que seria necessário radioterapia pós-cirurgia. [1, 104]

Não existem ensaios clínicos que comparem diretamente radioterapia vs. cirurgia, como tratamento local. No entanto, alguns estudos mostram a superioridade da cirurgia em relação à radioterapia, mas existe um viés de seleção, pois os doentes selecionados para radioterapia tendem a ter piores fatores de prognóstico. Análises a estes estudos, usando um sistema de pontuação para ajustar estes resultados à probabilidade de escolher cada tipo de tratamento e, assim, tentar eliminar este viés de seleção, mostraram que não havia diferenças significativas entre o uso de radioterapia, cirurgia ou uma combinação de ambas. [7, 108]

De acordo com uma análise retrospectiva recente, em tumores pequenos (<8cm), a radioterapia e a cirurgia têm a mesma eficácia. Em tumores maiores (≥ 8 cm), o uso de cirurgia em combinação com radioterapia mostrou-se superior ao uso isolado de cirurgia. No entanto, mais uma vez, também houve um viés de seleção, pois os doentes selecionados para radioterapia tinham piores fatores de prognóstico, como por exemplo, a localização e extensão do tumor que o tornavam irressecável e os doentes selecionados para cirurgia tinham tumores menores ou em ossos dispensáveis (por, exemplo, clavícula, costela). [104]

Estes dois tipos de tratamento apresentam, assim, vantagens e desvantagens distintas que têm de ser ponderadas de acordo com cada doente. A radioterapia pode causar neoplasias secundárias e alterações do desenvolvimento ósseo nas crianças, mas a cirurgia pode resultar em défices funcionais ou efeitos cosméticos importantes. Assim, estes dois tipos de tratamento local devem ser vistos como complementares e não como antagonistas. [104]

Sarcoma de Ewing localizado: a cirurgia costuma ser o método preferencialmente utilizado. A radioterapia é utilizada quando o défice funcional provocado pela cirurgia é demasiado elevado, ou em doentes que tenham tido tumores excisados com margens insuficientes. [7]

Sarcoma de Ewing metastizado: o tratamento local pode trazer benefícios em doentes com metástases extrapulmonares. Num estudo retrospectivo, o tratamento local do tumor primário e das metástases em comparação com o tratamento local apenas do tumor primário ou sem tratamento local mostrou melhor sobrevida livre de eventos (39% vs. 17% vs. 14%, $p < 0,001$). Outros estudos também mostram melhores resultados com utilização de radioterapia em todas as localizações de metástases. No entanto, tratam-se de estudos retrospectivos, não aleatorizados,

em que os doentes foram escolhidos diretamente pelo investigador, pelo que a sua interpretação deve ser feita com cuidado. A dose de radiação depende do local a irradiar. No caso de osso e tecidos moles, tanto com intenção curativa como paliativa, a dose cumulativa total de 40 Gy em 5 frações parece ter eficácia. Nos pulmões, doses entre 12 e 15 Gy, para radioterapia pulmonar é recomendada, mesmo após resolução completa das lesões com quimioterapia. [7, 35, 36, 109-113]

Sarcoma de Ewing recorrente: a recorrência do EWS é mais comum até dois anos após o diagnóstico inicial. O prognóstico global é reservado com uma sobrevivência aos 5 anos após recorrência, de 10 a 15%. Os fatores de prognóstico na doença recorrente são a idade, o intervalo livre de recorrência, o local de recorrência (local ou à distância vs. local e à distância) e recorrência pulmonar isolada. Nestes doentes, a escolha do tratamento tem de ter em conta vários fatores, tais como o local da recidiva e tratamentos prévios. Em relação ao controlo local da doença, também nestes casos se pode utilizar radioterapia e/ou cirurgia. Pode ser utilizada radioterapia paliativa nas lesões ósseas, mas a excisão cirúrgica poderá melhorar o prognóstico. Nas metástases pulmonares, poderá ser utilizada radioterapia pulmonar, e cirurgia para excisão de lesões residuais. [7, 114-118]

Quimioterapia

Nos anos 80, os fármacos vincristina, dactinomicina, ciclofosfamida e doxorrubicina eram universalmente aceites como quimioterapia para o EWS. O estudo IESSI (1972-78) do *US Intergroup* mostrou que a adição de doxorrubicina ao esquema terapêutica que combinava vincristina, dactinomicina, ciclofosfamida (VAC) era mais eficaz que a adição de radioterapia pulmonar a este esquema, que por sua vez era mais eficaz que o esquema VAC isolado, em doentes com EWS localizado. Num estudo seguinte do mesmo grupo, IESSII (1978-82), mostrou-se que, em doentes com EWS não-pélvico, o uso do esquema vincristina, dactinomicina, ciclofosfamida e doxorrubicina (VACA) em doses elevadas, em intervalos de 3 semanas resultava em maior sobrevida livre de recorrência do que o uso deste esquema de modo contínuo em doses moderadas. Num estudo posterior, do grupo *US POG (Pediatric Oncology Group) CCSG (Children's Cancer Study Group)*, INT-0091 (1988-92) mostrou que a adição de ifosfamida e etoposido (IE) à vincristina, doxorrubicina e ciclofosfamida (VDC) tinha benefícios na sobrevida livre de recorrência dos doentes com EWS localizado, mas não nos doentes com EWS metastático. No estudo seguinte do mesmo grupo, INT-154 (1995-98), o aumento da dose dos agentes alquilantes no esquema com vincristina, ciclofosfamida e doxorrubicina intercalado com ifosfamida e etoposido (VDC-IE) não teve aumento significativo da sobrevida livre de eventos, em doentes com EWS localizado. [31, 32, 119-122]

O estudo clínico aleatorizado COG-AEWS0031 do *Children's Oncology Group* (COG) mostrou que em doentes sem metástases, a administração de ciclos de ciclofosfamida, doxorrubicina e vincristina alternando com ciclos de ifosfamida e etoposido com intervalos de 2 semanas permitia uma sobrevida livre de eventos maior do que a administração dos ciclos com intervalos de 3 semanas. [7, 33]

O *German/Austrian Cooperative Ewing Sarcoma Study* (CESS), que mais tarde se juntou a outros grupos europeus para formar o *European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Study* (EICESS) e finalmente o *European Ewing tumor Working Initiative of National Groups* ou *EURO-EWING*, conduziu vários ensaios clínicos relativos ao tratamento desta doença. [54, 119-121]

O grupo CESS mostrou que o uso de ifosfamida aumenta a sobrevida livre de eventos nos doentes de alto risco, definidos por terem um volume tumoral superior a 100 ml ou num local

central/axial. O estudo CESS86, que incluiu 301 doentes tratados entre 1986 e 1992, publicado em 2001, mostrou que a sobrevida livre de eventos a 10 anos foi de 52% e que a melhoria do prognóstico dos doentes de alto risco se devia não só à adição de ifosfamida mas também ao tratamento multimodal, que incluía terapêutica local com radioterapia e excisão cirúrgica. [54, 120]

O ensaio clínico aleatorizado EICESS-92 incluiu 647 doentes, que receberam terapêutica de indução com vincristina, dactinomicina e ifosfamida (VAI), seguida de cirurgia. De seguida, os doentes foram separados em dois grupos. Os 155 doentes do grupo de baixo risco, que tinham tumores localizados com volume inferior a 100ml, foram aleatorizados em dois grupos. Metade recebeu 10 ciclos de quimioterapia de manutenção com vincristina, dactinomicina, ifosfamida e doxorubicina (VAIA). A outra metade recebeu 10 ciclos de quimioterapia de manutenção com vincristina, dactinomicina, ciclofosfamida e doxorubicina (VACA). Os 492 doentes de alto risco, que tinham tumores localizados com volume superior a 100 ml ou doença metastática, foram também aleatorizados em dois grupos. Metade recebeu 14 ciclos de VAIA e a outra metade recebeu 14 ciclos de VAIA com etoposido. Nos doentes de baixo risco, a ciclofosfamida pareceu ter efeito semelhantes à ifosfamida na sobrevida livre de eventos e na sobrevida global. Nos doentes de alto risco, a adição de etoposido parece mostrar benefícios, no entanto, sem significância estatística. [7, 103, 120]

O ensaio clínico aleatorizado EURO-EWING-INTERGROUP-EE99 pretendia estudar se a ciclofosfamida poderia substituir a ifosfamida em combinação com a vincristina e a dactinomicina (esquema VAC vs. esquema VAI) após terapêutica de indução intensiva com vincristina, ifosfamida, doxorubicina e etoposido (VIDE) em doentes com EWS localizado de risco normal. Todos os doentes receberam terapêutica de indução com seis ciclos de vincristina, ifosfamida, doxorubicina e etoposido (VIDE), seguida de terapêutica local e depois um ciclo de vincristina, dactinomicina e ifosfamida (VAI). Os doentes com boa resposta histológica à quimioterapia ou com tumores localizados com menos de 200 ml no início do estudo foram considerados de risco normal, perfazendo um total de 856. Foram aleatoriamente separados em dois grupos. Um recebeu terapêutica de manutenção com sete ciclos de vincristina, dactinomicina e ciclofosfamida (VAC) e o outro, sete ciclos de VAI. Não houve diferenças significativas na sobrevida livre de eventos nem na sobrevida global, entre os dois grupos. A sobrevida livre de eventos a 3 anos foi de 77%. A toxicidade renal aguda foi mais elevada no braço que recebeu VAI mas a toxicidade hematológica foi maior no braço VAC. Os resultados em relação a alterações da função renal e da fertilidade a longo prazo ainda estão por aguardar.

O uso alternado destes dois agentes poderá ser benéfico, por diminuição das doses cumulativas e, conseqüentemente, dos efeitos adversos tardios. ^[119, 120, 123]

A adição de ifosfamida em elevadas doses ao esquema terapêutico de quimioterapia (3 ciclos de VDC seguidos de 3 ciclos de IE, seguidos de 1 ciclo de VDC) não aumenta a toxicidade nem melhora os resultados clínicos, em doentes com EWS metastático. ^[124]

Num estudo do *Brazilian Cooperative Study Group*, a incorporação de carboplatina nos regimes terapêuticos não mostrou melhoria do prognóstico, tanto nos grupos de baixo como de alto risco, mas mostrou aumento da toxicidade significativo. ^[125]

Noutro estudo do COG, AEWS07P1 (2008-2013), que consistia num ensaio clínico multicêntrico piloto de segurança e toxicidade, em que entraram 35 doentes com EWS localizado a quem foi administrado 17 ciclos de topotecano e ciclofosfamida combinados com vincristina (VTC) e vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida (VDC) e ifosfamida-etoposido (IE), administrados com intervalos de 2 semanas (em vez de 3 semanas). O tratamento local ocorreu após 6 ciclos. Os doentes foram seguidos durante um período de 5 anos. A sobrevida livre de eventos a 5 anos foi de 79,6% (IC95%: 61,8-89,7%). Seis doentes recidivaram e dois desenvolveram neoplasias malignas secundárias (sarcomas ósseos indiferenciados) no local irradiado. Quatro doentes morreram, 3 devido a recidiva do EWS e 1 por leucemia aguda mielogénea. A sobrevida global a 5 anos foi de 88%. Este estudo pretendia estudar a segurança e toxicidade deste regime de quimioterapia antes de se iniciar um estudo de fase III. ^[126]

O estudo EURO-EWING 2012, que está a decorrer, pretende comparar dois esquemas de quimioterapia. Num braço, os doentes receberão 6 ciclos de VIDE seguido de 8 ciclos de VAC, com e sem ácido zoledrónico. Noutro, os doentes receberão 5 ciclos de VDC+IE seguido de 3 ciclos de VDC alternado com 4 ciclos de IE ou seguido de 3 ciclos de vincristina com ciclofosfamida (VC) alternado com 4 ciclos de IE mais ácido zoledrónico. O uso de bisfosfonatos, particularmente, de ácido zoledrónico tem mostrado resultados promissores em estudos pré-clínicos, pelo que foi incorporado também neste estudo. ^[119, 127-129]

Quimioterapia em Doses Elevadas com Transplante de Células Estaminais

Em doentes com risco elevado de recidiva de EWS, vários investigadores têm tentado utilizar quimioterapia em elevadas doses com transplante de células estaminais hematopoiéticas, como tratamento de consolidação. Vários fármacos têm sido testados combinações de quimioterapia de doses elevadas, como por exemplo, carmustina, carboplatina, ciclofosfamida, etoposido, melfalano, tiotepa, procarbazina, bussulfano e treossulfano. [7, 37, 119, 130-138]

Em estudos prospetivos e retrospectivos, em doentes com EWS com elevado risco de recorrência ou com metástases à distância, a terapêutica com doses elevadas de quimioterapia com transplante de células estaminais não mostrou benefício. Ainda que estudos mais pequenos reportem benefícios no uso deste tipo de terapêutica, os doentes destes estudos são selecionados com base numa boa resposta inicial à quimioterapia normal, ou os ensaios são de braço único e usam controlos históricos de doentes com mau prognóstico. [7, 119, 134, 139]

No ensaio EURO-EWING-INTERGROUP-EE99 está também ser estudada esta abordagem terapêutica. Nos doentes com EWS localizado mas com má resposta histológica ou volume tumoral inferior a 200 ml após a quimioterapia de indução foram separados em dois grupos. Um recebeu 7 ciclos de VAI e outro recebeu bussulfano e melfalano em doses elevadas. Os doentes que tivessem doença metastática apenas pulmonar foram também separados em dois grupos semelhantes aos anteriores, mas o grupo que fez VAI recebeu também radioterapia pulmonar. O estudo já está completo mas aguardam-se os resultados. Ainda neste ensaio, foram estudados doentes com EWS com metástases extrapulmonares tratados com bussulfano e melfalano em doses elevadas após quimioterapia de indução com 6 ciclos de VIDE e 1 ciclo de VAC/VAI. A sobrevida global foi de 34%. A terapêutica multimodal intensiva poderá ter benefícios em doentes com EWS metastático. No estudo EWING 2008, em doentes com EWS com metástases extrapulmonares, também se pretende avaliar o uso de treossulfano e melfalano em doses elevadas com VAC convencional. Os grupos *Italian Sarcoma Group* e *Scandinavian Sarcoma Group* também estão a estudar o uso de treossulfano e melfalano em doentes com doença metastática exta-pulmonar. [7, 37, 119]

Um estudo retrospectivo recente, que analisou casos entre 1986 e 2012, em que doentes com tumores da família de EWS receberam quimioterapia em doses elevadas seguida de transplante de células estaminais hematopoiéticas, esta terapêutica pareceu mostrar resultados promissores, com baixa toxicidade. [140]

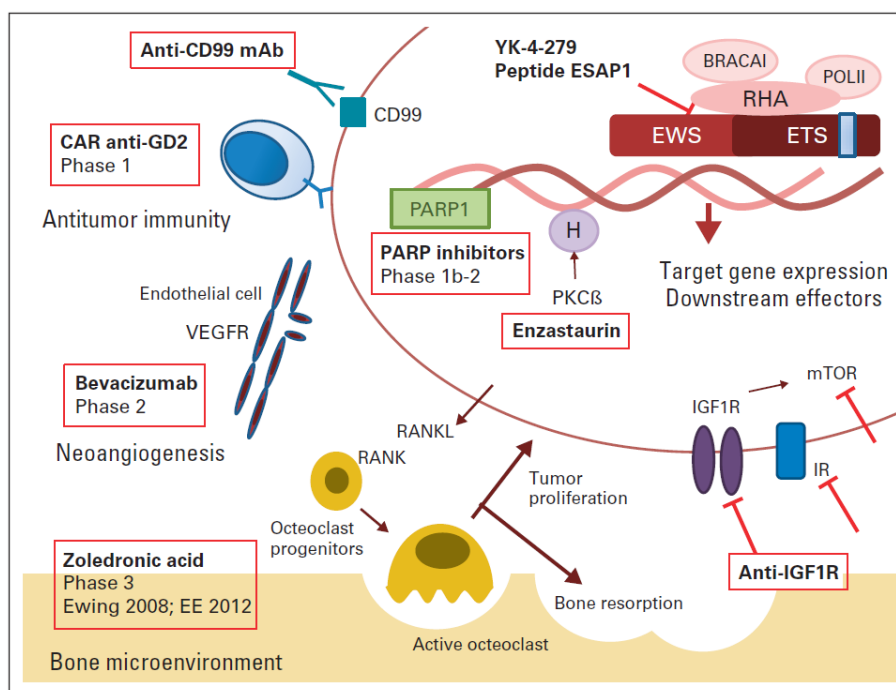


Figura 2 – Esquema de potenciais alvos terapêuticos no EWS. Retirado de [119]

O **figitumumab** (CP-751,871) é um anticorpo monoclonal humano que impede a ligação IGF-1 ao IGF-1R, prevenindo assim a ativação deste recetor. Num ensaio clínico (NCT00560235) aberto não aleatorizado, de segurança e eficácia, 138 doentes com tumores da família do EWS recidivados ou refratários receberam o fármaco CP-751,871 na dose final de 30 mg/kg IV no Dia 1 de um ciclo de 28 dias até progressão da doença ou toxicidade. No final da fase I, concluiu-se que o Figitumumab é bem tolerado e tem atividade antitumoral no EWS - a taxa de resposta objetiva foi de 14,2% (8,1-22,3; IC 95%); a sobrevida livre de progressão foi de 1,9 meses (1,8-2,1; IC 95%), sobrevida global 8,9 meses (7,2-10,8; IC 95%), nº de participantes com anticorpos antifármaco (ADA) positivos foi de 0 em 107 doentes analisados. [149-152]

O **cixutumumab** (IMC-A12) é um anticorpo monoclonal humano IgG1 que se liga com elevada afinidade ao IGF-1R, inibindo a ativação deste recetor e a ativação da cascata de sinalização subsequente. Num ensaio clínico de fase II do COG, o uso de cixutumumab em combinação com temsirolimus (inibidor de mTOR) não mostrou respostas objetivas no tratamento de EWS, 11 em 11 doentes com EWS não responderam à terapêutica e 3 em 11 tiveram efeitos adversos graves. Outro ensaio clínico de fase II do COG mostrou que nos tumores da família do EWS, 11 em 13 doentes não responderam à terapêutica com cixutumumab e 5 em 13 doentes tiveram efeitos adversos graves com esta terapêutica. Num

terceiro ensaio clínico em doentes com tumores da família do EWS tratados com cixutumumab e temsirolimus em combinação, cinco dos 17 doentes com EWS, obtiveram regressão tumoral superior a 20%; um doente que tinha desenvolvido resistência a outro anti-IGF-1R anteriormente obteve uma resposta completa. Do total destes 17 doentes com EWS, dois obtiveram uma resposta completa e três uma resposta parcial. ^[153-156]

O **ganitumab** (AMG 749) é um anticorpo monoclonal humano contra o IGF-1R. Está em curso, na fase de recrutamento, um ensaio clínico de fase II, que pretende tratar doentes com EWS metastático recentemente diagnosticado, utilizando quimioterapia combinada com ou sem ganitumab (NCT02306161). No ensaio clínico de fase I, dois dos 12 doentes com EWS responderam ao tratamento – uma resposta completa e uma resposta parcial não confirmada. Noutro ensaio clínico de fase II, dos 19 doentes com EWS tratados e avaliados, um teve resposta parcial e outro teve doença estabilizada por um período de ≥ 24 semanas. A mediana de sobrevida livre de progressão foi de 7,9 meses. ^[141, 150, 157-159]

O **R1507** é um anticorpo monoclonal humanizado anti-IGF-1R. Num ensaio clínico multicêntrico de fase II, 115 doentes com tumores da família do EWS recorrentes ou refratários foram tratados com R1507. A taxa de resposta parcial ou total foi de 10% com uma duração mediana da resposta de 29 semanas e uma sobrevida global mediana de 7,6 meses. Um dos 11 doentes com resposta ao tratamento teve resposta completa e os restantes 10 tiveram resposta parcial. A mediana da progressão livre de doença foi de 1,3 meses. Os efeitos adversos mais frequentes foram dor (15%), anemia (8%), trombocitopenia (7%) e astenia (5%). ^[141, 160, 161]

O **linsitinib** (OSI-906; ASP7487) é uma pequena molécula inibidora do IGF-1R. Este fármaco encontra-se em estudo (NCT02546544). Trata-se de um ensaio clínico internacional, multicêntrico, de braço único, de fase II, que pretende determinar a segurança e atividade da inibição do anti-IGF-1/IR em doentes com tumores da família do EWS recidivados e/ou refratários. Cerca de 40 doentes de 5 a 7 países europeus entraram no estudo. Cada doente será tratado com linsitinib 600 mg/id *per os* nos dias 1-3, 8-10 e 15-17 num ciclo de 21 dias até progressão da doença ou toxicidade intolerável. Este estudo começou em Janeiro de 2015 e encontra-se atualmente na fase de recrutamento de doentes. Os objetivos primários são determinar o efeito farmacodinâmico do fármaco no tumor e a sua segurança e tolerância e os objetivos secundários são avaliar os resultados clínicos através da progressão livre de doença e da sobrevida específica da doença. ^[150, 162]

O **BMS-754807** é uma pequena molécula antagonista ATP-competitiva do IGF-1R, que mostrou atividade *in vitro* e *in vivo* contra modelos de EWS, em estudos pré-clínicos pediátricos. O **ADW742** é outra pequena molécula inibidora do IGF-1R que mostrou resultados promissores *in vitro* em linhagens celulares de EWS, nomeadamente subregulação da fosforilação IGF-1R/AKT/mTOR e inibição da proliferação celular por bloqueio em G1 e apoptose. Estas ações eram sinérgicas com a adição de imatinib (inibidor mTOR) ou de agentes de quimioterapia como a vincristina e a doxorrubicina. O **NVP-AEW541** e o **NVP-ADW742** são pequenos inibidores seletivos de IGF-1R, com estudos pré-clínicos completos. [141, 147, 163-165]

Estes últimos inibidores do IGF-1R necessitam de mais estudos para comprovar e esclarecer a sua eficácia, segurança e utilidade clínica. As terapêuticas dirigidas contra o IGF-1R mostraram atividade antineoplásica em pequenos grupos de doentes com EWS, o que pode significar que haverá algum biomarcador preditor de resposta à terapêutica e de prognóstico. No entanto, ainda nenhum biomarcador foi identificado. O nível de IGF-1R não se correlaciona com a resposta à terapêutica. [141, 142, 166]

Resultados de um estudo pré-clínico em linhagens celulares e modelos de xenoenxerto de neuroblastoma e EWS, sobre o uso do anticorpo monoclonal humano anti-IGF-1/IGF-2 **m708.5** em combinação ou não com temsirolimus, mostrou que o uso isolado de m708.5 tem ação antitumoral e que o uso dos dois fármacos em conjunto prolonga a sobrevida dos ratinhos e atrasa a progressão tumoral. Não existem ainda estudos clínicos com este fármaco a decorrer. [167]

2. **mTOR**

Alterações, tanto genéticas como epigenéticas da via PI3K/AKT/mTOR levam a tumorigénese e progressão tumoral do EWS. A ativação da via PI3K/AKT/mTOR leva a níveis sobreexpressados de Akt fosforilado. [141, 143, 168, 169]

O **ridaforolimus** (deforolimus; AP23573; MK-8669) é um análogo da rapamicina que inibe seletivamente mTOR, bloqueando a proliferação e migração de células de músculo liso vascular. Num ensaio clínico de fase I, múltiplos tipos de tumores foram tratados com ridaforolimus, incluindo um doente com EWS. Este obteve uma resposta parcial durante 2 meses e teve uma redução significativa das metástases pleurais. Está um estudo a decorrer sobre o uso de ridaforolimus em doentes de idade pediátrica com tumores sólidos avançados (NCT01431534). Existem alguns ensaios clínicos com ridaforolimus que englobam múltiplos

tipos de tumores, mas não estão disponíveis os resultados especificamente relativos aos doentes com EWS. [141, 150, 170-173]

O *temsirolimus* (CCI-779) é um éster de rapamicina que inibe a função de mTOR, inibindo o ciclo celular. Num ensaio clínico de fase I, um dos sete doentes com EWS que receberam temsirolimus, irinotecano e temozolomida, atingiu doença estável e continuou a terapêutica por mais cinco meses sem evidência de progressão de doença. No entanto, este efeito pode ser devido ao uso de irinotecano e temozolomida. Está a decorrer um ensaio clínico de fase II em doentes com sarcomas recorrentes ou refratários sobre o uso de temsirolimus e cixutumumab em combinação (NCT01614795). [141, 150, 174, 175]

O *sirolimus* (rapamicina) é um inibidor de mTOR que inibe o crescimento tumoral e tem atividade antitumoral. Está a decorrer um ensaio clínico sobre o uso de sirolimus em combinação com quimioterapia em doentes com tumores sólidos refratários ou recorrentes (NCT01331135). Outro estudo (NCT02574728), em fase de recrutamento, pretende também estudar o uso de sirolimus em combinação com quimioterapia metronómica em doentes com tumores sólidos recorrentes ou refratários, incluindo EWS, e tumores do sistema nervoso central. [150]

O *CC-115* é também um inibidor de mTOR. Está a decorrer um ensaio clínico (NCT01353625) sobre o seu uso em doentes com tumores sólidos em estado avançado e em neoplasias hematológicas. [150]

Os inibidores do mTOR têm mostrado maior eficácia quando em combinação com outros agentes, como por exemplo, os anti-IGF-1R, do que se usados isoladamente. A inibição do mTOR liberta o mecanismo de retrocontrolo inibitório sobre o substrato do recetor de insulina 1, sobre-regulando o PI3K e o AKT, em dependência do IGF-1/IGF-1R. Para além disso, a inibição mTOR também provoca a libertação autócrina de IGF-1, que pode ser bloqueada pelos anti-IGF-1R. Estudos sugerem que a resistência à monoterapia com anti-IGF-1R pode ser provocada pela ativação a jusante da via PI3K/mTOR. Assim, seria uma das explicações para a maior eficácia destes agentes quando em combinação com inibidores mTOR. Conforme referido acima, num ensaio clínico com 17 doentes com EWS tratados com temsirolimus em combinação com cixutumumab, 5 tiveram resposta completa ou parcial. Num outro estudo que usou a combinação temsirolimus/cixutumumab em vários tipos de sarcoma, mostrou que de facto, esta associação de fármacos leva a maiores taxas de resposta. [141, 155, 170, 176-182]

3. *Tirosina cinases*

3.1. *PDGFR α e KIT*

O PDGFR α e o KIT são recetores de tirosina cinase, expressos e ativados em amostras de EWS. [141, 183]

O fármaco inibidor destes recetores *imatinib* foi já usado em estudos pré-clínicos e clínicos em EWS. Os estudos *in vitro* mostraram bons resultados, mas a IC50 de imatinib era muito superior aos níveis obtidos na clínica. Num ensaio de fase II em doentes com tumores pediátricos refratários ou recorrentes, um em 24 doentes com EWS teve uma resposta parcial. Apesar de a taxa de resposta ser baixa, biomarcadores como o nível de expressão de PDGFR α e KIT poderiam indicar o grupo de doentes que mais beneficiariam com esta terapêutica. Noutro ensaio de fase II em que o nível de expressão do PDGFR α e do KIT eram critérios de inclusão, um dos cinco doentes com EWS teve uma resposta parcial após oito meses de tratamento. Neste estudo, os doentes que responderam à terapêutica tinham os maiores níveis de expressão de PDGFR α e KIT. Do mesmo modo que os inibidores mTOR, também se coloca a hipótese de a atividade dos inibidores destes recetores ser aumentada pelo uso em combinação de outros fármacos dirigidos a estas vias de sinalização. [46, 141, 183-186]

O *regorafenib* é uma pequena molécula inibidora do VEGFR-1, -2 e -3, Ret, Kit, PDGFR, FGFR1 e B-RAF cinases. Há dois ensaios clínicos de fase II a decorrer (NCT02389244; NCT02048371) [150, 187]

O *dasatinib* é uma pequena molécula inibidora de SRC/ABL tirosina cinases e do KIT. Num estudo *in vitro* em linhagens celulares de EWS e neuroblastoma, o dasatinib inibe a proliferação mas não induz a apoptose celular no EWS. Mostrou também actividade antimigratória das células EWS, o que poderá ter interesse na prevenção das metástases. Existe um ensaio clínico (NTC00788125) de fase I/II a decorrer, em doentes com tumores sólidos recorrentes ou metastáticos com o dasatinib como estratégia terapêutica em combinação com outros agentes de quimioterapia. Outro ensaio clínico, de fase II, a decorrer, pretende estudar o uso de dasatinib como agente isolado em doentes com sarcomas avançados. Existe ainda um ensaio clínico (NCT01643278) a decorrer, em doentes com tumores do estroma gastrointestinal (GIST) e noutros sarcomas de tecidos moles metastáticos ou irressecáveis, que tem como estratégia terapêutica o uso de dasatinib em combinação com ipilimumab. O *ipilimumab* é um anticorpo monoclonal humano contra o CTLA-4, um antígeno que suprime a resposta das células T. Ao inibir este regulador negativo da função leucocitária, potencia-se a resposta imune

antitumoral. Para além do estudo acima descrito, existe outro ensaio clínico a decorrer, em doentes com tumores ou sarcomas sólidos refratários ou recorrentes, que pretendem estudar o uso de nivolumab (anticorpo monoclonal anti-PD-1; o PD-1 medeia a inibição da ativação de células T) com ou sem ipilimumab. [150, 188, 189]

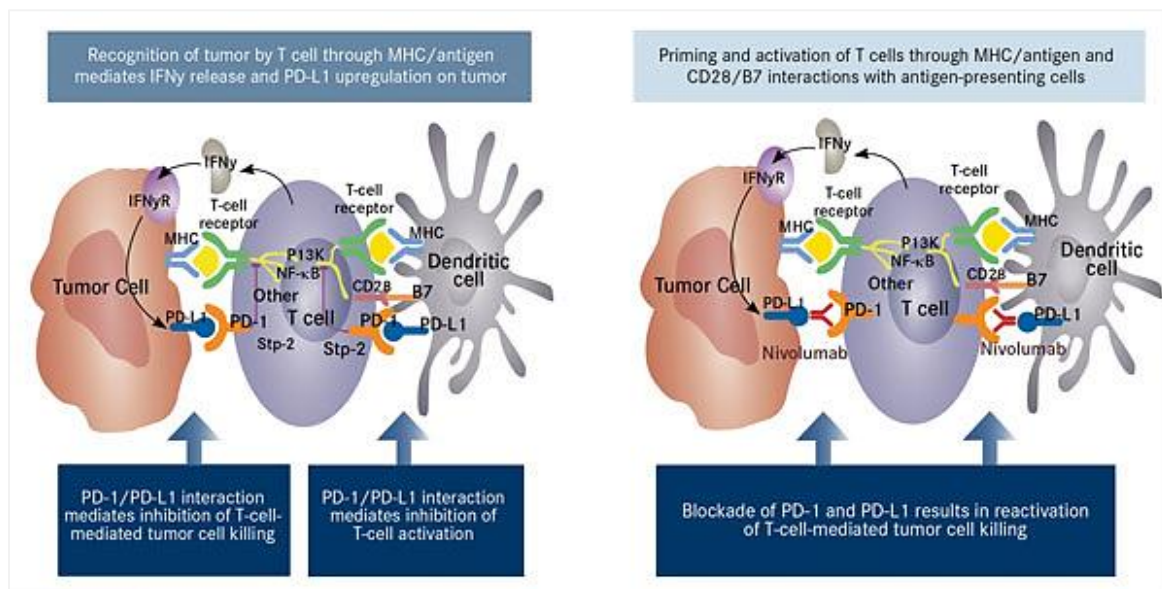


Figura 3 - Ação de PD-1 e consequências do seu bloqueio. Retirado de <http://global.onclive.com>.

3.2. EGFR

A ativação do EGFR, que é um recetor de tirosina cinase, leva à ativação das vias de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR, modulando assim a proliferação celular, o crescimento tumoral e a angiogénese. [183]

O *gefitinib* é uma pequena molécula inibidora do domínio cinase intracelular do EGFR e num estudo de fase I, em doentes pediátricos com tumores sólidos, um em três dos doentes com EWS teve uma resposta parcial que durou 10 semanas. O mecanismo de ação permanece desconhecido. No entanto, no caso de carcinoma do pulmão de não-pequenas células, algumas mutações somáticas do EGFR estão relacionadas com a resposta aos inibidores deste recetor. Outros estudos mostraram não haver correlação entre os níveis plasmáticos basais de EGFR e de VEGF e a actividade antitumoral, assim como também não houve alteração dos níveis destas moléculas em doentes responsivos à terapêutica. [141, 190-198]

3.3. VEGFR

A via de sinalização ativada pela ligação VEGF-VEGFR promove a angiogénese. Nos tumores da família do EWS, é considerado o regulador da angiogénese mais importante, o que o torna um alvo terapêutico com elevado potencial. [141, 199, 200]

O **cediranib** é uma pequena molécula ATP-competitiva que se liga aos domínios de tirosina cinase do VEGFR2. Num ensaio de fase I, em tumores pediátricos refratários, um dos três doentes com EWS teve uma resposta parcial com uma regressão tumoral superior a 77%. [141, 201, 202]

O **bevacizumab** é um anticorpo monoclonal humanizado contra o VEGF. Num ensaio piloto para o estudo da sinergia da adição de bevacizumab a um esquema de quimioterapia com vincristina, irinotecano oral e temozolomida (VOIT), em doentes pediátricos e jovens adultos com tumores sólidos, os dois únicos doentes com EWS obtiveram uma resposta – um abandonou o estudo em remissão completa e o segundo teve uma resposta parcial. Noutro ensaio clínico (NCT00516295), de fase I, em doentes com EWS extracraniano refratário ou com primeira recorrência, 6 doentes, com idades entre os 12 e os 20 anos, receberam bevacizumab, vincristina, topotecano e ciclofosfamida e obtiveram uma média de intervalo até progressão da doença de 442 dias (não houve doentes no braço controlo a não receber bevacizumab). Está outro ensaio clínico de fase II (NCT01492673) a decorrer, em fase de recrutamento, que pretende estudar a administração de bevacizumab, topotecano e ciclofosfamida. Num outro ensaio clínico de fase II (NCT01946529), doentes com tumores da família do EWS e tumores desmoplásicos de células pequenas e redondas irão receber vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, ifosfamida, etoposido, irinotecano, temozolomida, temsirolimus, bevacizumab, e sorafenib e será avaliada a eficácia desta terapêutica. [141, 150, 203]

O **pazopanib** é uma pequena molécula inibidora do VEGFR-1, -2 e -3 e do PDGFR. Num estudo de caso clínico, um doente com EWS retroperitoneal recorrente extra-ósseo foi tratado com pazopanib e teve regressão tumoral, mas sem se comprovar aumento da sobrevida. Num outro estudo recente de caso-controlo, um doente com EWS extra-ósseo metastático tratado com pazopanib em 4ª linha de tratamento teve regressão tumoral das metástases. Pelos resultados obtidos neste caso, foi adicionado um novo braço ao estudo com regorafenib a decorrer (NCT02048371) com doentes com tumores da família do EWS. Outro estudo também de uma doente com EWS metastático, mostrou uma resposta parcial ao pazopanib, seguida de progressão da doença após 12 semanas. No entanto, outros dois estudos mostraram não haver

resposta do EWS ao pazopanib. São necessários ensaios clínicos de maior dimensão para melhor avaliação da eficácia deste inibidor multi-cinase. Está a decorrer um ensaio clínico (NCT01956669) em doentes com tumores sólidos, incluindo EWS, para estudo da eficácia do pazopanib. [141, 150, 204-207]

O *regorafenib* é outro fármaco que atua sobre o VEGFR, conforme descrito acima.

O *sorafenib* é uma pequena molécula inibidora de Raf-1, membro da cascata RAF/MEK/ERK, do VEGFR-2 e -3, PDGFR- β , Flt-3 e c-KIT. O sorafenib altera a permeabilidade vascular e reduz a hipertensão intersticial intratumoral. Num ensaio clínico (NCT00330421) de fase II, doentes com sarcomas de partes moles foram tratados com sorafenib e os resultados clínicos foram avaliados através da pressão de fluido intersticial intratumoral, dos biomarcadores séricos circulantes e da densidade vascular do sarcoma. A pressão de fluido intersticial intratumoral correlaciona-se com o tamanho do tumor e este parâmetro diminui em dois doentes com doença estável que estavam a ser tratados com este fármaco. Também se mostrou que o sorafenib diminui os níveis circulantes de biomarcadores consistentes com o bloqueio da cascata VEGF. Atualmente estão a decorrer dois ensaios clínicos que utilizam este fármaco em tumores sólidos, estando ambos em fase de recrutamento. Um deles, já referido (NCT01946529) porque também inclui o uso de temsirolimus e de bevacizumab, é em doentes com tumores da família do EWS e tumores desmoplásicos de células pequenas e redondas. O outro (NCT02048371) é em doentes com lipossarcoma, sarcoma osteogénico e EWS/tumores da família de EWS. [150, 208, 209]

Ainda não existem biomarcadores disponíveis para selecionar os doentes para tratamento anti-angiogénico. Um estudo parece sugerir que dois polimorfismos da linha germinal do VEGF (VEGF-2578 AA e VEGF-1154 AA) estão associados a maior sobrevida global em doentes com neoplasia da mama tratados com bevacizumab. Outros estudos sugerem que o VEGFR1 modula negativamente a angiogénese, enquanto o VEGFR2 promove ativamente este processo. Em estudos de neoplasia do cólon, doentes com elevadas concentrações plasmáticas de VEGFR1 não beneficiavam tanto da terapêutica com bevacizumab em comparação com doentes com baixas concentrações. A mutação do VEGFR1 Y0153D está associada com resistência ao sorafenib. [141, 210-213]

4. *EWS-FLI1 e alvos moleculares relacionados*

O produto de fusão EWS-FLI1 é específico das células de EWS, o que o torna um excelente alvo terapêutico potencial. Este produto é um ativador de transcrição e regulador de múltiplos genes em diferentes situações. Fármacos dirigidos com mecanismos de ação distintos podem atingir este alvo terapêutico: o produto de fusão EWS-FLI1, moduladores de transcrição a que o EWS-FLI1 se liga, genes desregulados pelo EWS-FLI1. [141, 214-216]

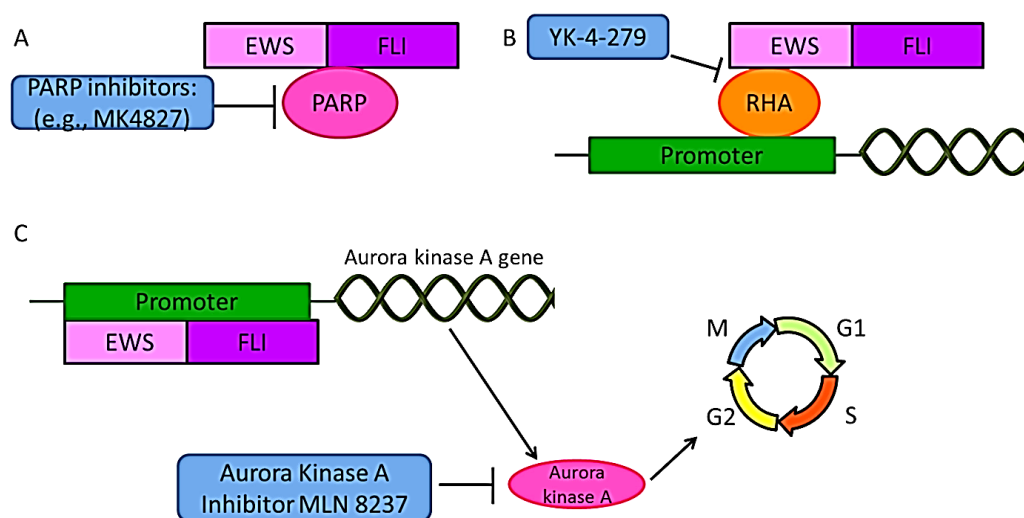


Figura 4 – Alvos terapêuticos relacionados com o EWS-FLI1. Retirado de [141]

4.1. *RHA*

A RNA helicase A (RHA) é um modelador de transcrição de elevada expressão nas células de EWS, que ao ligar-se ao gene EWS-FLI1, leva à sua transcrição. O **YK-4-279**, ao interromper a ligação entre EWS-FLI1 à RHA, induz a apoptose das células de EWS. Num estudo pré-clínico de uma formulação oral de YK-4-279 mostraram inibição do crescimento tumoral significativa em modelos murinos. Neste estudo, identificaram-se também mecanismos de resistência das células de EWS a este fármaco, que mostrou ter resistência cruzada com o imatinib e a enzastaurina (inibidor da PKC- β), e ainda que existe sinergia na ação combinada de YK-4-279 com enzastaurina. [141, 217-219]

4.2. Aurora cinase A

A aurora cinase A é uma serina treonina cinase envolvida na regulação da entrada em mitose celular. A inibição das aurora cinases A e B aumenta a vulnerabilidade das células de EWS. Além disso, o EWS-FLI1 sobrerregula a expressão de aurora cinases A e B por ligação ao seu promotor. Estudos pré-clínicos com o inibidor de aurora cinase A **Alisertib** (MLN8237) em modelos de xenoenxertos tumorais mostraram respostas completas mantidas. Um ensaio clínico de fase II sobre o uso do fármaco em tumores sólidos ou leucemia refratários ou recorrentes foi recentemente completado mas ainda não existem resultados publicados (NCT01154816). [150, 220-223]

4.3. Assinatura genética do EWS-FLI1

Vários fármacos têm sido investigados pelo seu potencial de reverter ou inibir as ações celulares desencadeadas pela expressão do EWS-FLI1. [141]

A **Trabectedina** (Ecteinascidin-743) é um alcaloide com propriedades antitumorais. Este fármaco mostrou mecanismos de ação com elevada especificidade em sarcomas com translocações, por alterar as oncoproteínas de fusão, produto da expressão génica destas translocações, e que são críticas para a patogénese e progressão tumoral. Num estudo recente, dos cinco doentes com EWS tratados com trabectedina, um teve resposta parcial com doença estabilizada. São necessários mais estudos com um maior número de doentes, mas este fármaco poderá ter um elevado potencial terapêutico. [224-226]

A **Citarabina** é um análogo de nucleósido usado em neoplasias hematológicas. Num ensaio clínico de fase II do COG, não houve qualquer resposta a este fármaco em nenhum dos doentes com EWS. Num estudo pré-clínico mais recente, a citarabina também não mostrou actividade contra linhagens celulares *in vitro* nem com enxertos de EWS *in vivo*. [141, 227, 228]

A **Mitramicina** é um antibiótico que se liga ao ADN e que regula a transcrição de alguns genes específicos, através da inibição da família de genes de fatores de transcrição SP1, levando à inibição do crescimento celular tumoral, mas não de células normais. Em estudos pré-clínicos, este fármaco mostrou efeitos antitumorais contra linhagens celulares e xenoenxertos de EWS. Noutro estudo, mostrou-se que em EWS poderá haver um mecanismo adicional de ação deste fármaco, através a repressão epigenética de alguns genes. Está atualmente a ser estudado num ensaio clínico (NCT01610570) de fase I/II, sem resultados ainda publicados. [141, 150, 229, 230]

4.4. PRKCB

A proteína cinase PKC- β fosforila a histona H3T6 que leva a aumento da sobrevivência celular *in vitro* e ao crescimento tumoral *in vivo* em linhagens celulares de EWS. A inibição desta proteína pela **Enzastaurina** (fármaco inibidor desta proteína) poderá ter um potencial terapêutico no EWS, conforme mostraram estudos pré-clínicos. No entanto, ainda não estão a decorrer ensaios clínicos deste fármaco neste tumor. [141, 231]

4.5. Poli-ADP-Ribose Polimerase (PARP)

A PARP tem como uma das principais funções a reparação das quebras de ADN. A inibição da PARP-1 provoca a diminuição de ADN danificado seguida de diminuição da expressão das proteínas de fusão EWS-FLI1 e EWS-ERG. Num estudo recente, mostrou-se que o uso de inibidores da PARP aumenta a suscetibilidade das células de EWS à ação da temozolomida, pelo que vários estudos clínicos estão a decorrer neste sentido. [141, 232]

O **Olaparib** (AZD2281), inibidor da PARP, mostrou ser bem tolerado e seguro num ensaio clínico de fase II. Não foram registadas respostas significativas nem controlo efetivo da doença, mas prosseguem os estudos deste inibidor com outros fármacos de quimioterapia. Está a decorrer um ensaio de fase II com o uso de olaparib em doentes com EWS refratário ou recorrente, após falência de quimioterapia (NCT01583543) e outro ensaio de fase I sobre o uso de olaparib em combinação com temozolomida em doentes com EWS (NCT01858168). [150, 232, 233]

O **Talazoparib** (BMN-673), inibidor da PARP, não mostrou actividade antitumoral muito exuberante como agente isolado em doentes com EWS. No entanto, está a ser estudado em ensaios clínicos em combinação com a temozolomida ou com topotecano, tendo mostrado resultados muitos promissores, no primeiro caso. Estão em curso, em fase de recrutamento, dois ensaios clínicos com o uso deste fármaco em doentes com EWS. Um, pretende estudar o efeito do talazoparib em combinação com temozolomida (NCT02116777) e outro em combinação com ou sem irinotecano (NCT02392793). Está ainda a decorrer um ensaio de fase I (NCT01286987) em doentes com tumores sólidos, incluindo EWS, sobre o uso de talazoparib isolado. [150, 234]

O **Niraparib** (MK4827) é um inibidor da PARP, que está em estudo num ensaio clínico de fase I, em combinação com temozolomida, em doentes com EWS incurável, previamente tratado (NCT02044120). [150]

5. *Imunoterapia dirigida*

5.1. *Vacinação dirigida à proteína de fusão EWS-FLI1*

Num estudo piloto, utilizou-se péptidos derivados da região de quebra das proteínas de fusão características do EWS, mas os resultados mostraram que houve fraca actividade antitumoral, devido a baixa afinidade ao HAL-A2.1 que, pela instabilidade da ligação péptido-complexo de MHC, impediu a indução de linfócitos T. Noutro estudo, os péptidos utilizados conseguiram induzir os linfócitos T e provocar a morte celular. No entanto, mais estudos pré-clínicos são necessários antes de se avançar com ensaios clínicos. [141, 235, 236]

5.2. *CD99*

O CD99, ainda que não específico de EWS, está presente na superfície deste tumor em mais de 90% dos casos e inibe a diferenciação neural, aumentando a proliferação celular e crescimento tumoral. Um anticorpo marcado com ^{64}Cu mostrou resultados promissores em estudos pré-clínicos mas ainda não há ensaios clínicos para determinar a utilidade terapêutica deste fármaco. [141, 237]

5.3. *GD2*

O GD2 é um antígeno de superfície de muitas células tumorais mas não da maioria das células normais, pelo que constitui um alvo com potencial terapêutico. Estudos clínicos e pré-clínicos com anticorpos anti-GD2 mostraram resultados favoráveis. Células T específicas de GD2 mostraram actividade antitumoral em xenoinxertos de EWS. Num ensaio clínico, o uso de anti-GD2 com Fator Estimulante de Colónias de Granulócitos e Monócitos (GM-CSF) e IL-2 aumentou a sobrevida e a sobrevida livre de progressão em doentes com neuroblastoma. Estão a decorrer vários ensaios clínicos com o uso de terapêutica dirigida contra o GD2. Um ensaio clínico de fase I (NCT00743496) em doentes com neuroblastoma, osteossarcoma, EWS e melanoma, sobre o uso de anticorpo humanizado anti-GD2, que está atualmente em fase de recrutamento. Outro ensaio, de fase II, pretende estudar o uso de anticorpo monoclonal ^{131}I 3F8 (anti-GD2) em doentes com vários tipos de tumores, entre os quais se inclui EWS (NCT00445965). Um terceiro ensaio, de fase I, ainda em recrutamento de doentes com tumores GD2+, pretende estudar o uso de células T modificadas por engenharia molecular para expressarem recetores quiméricos de antígenos anti-GD2 (NCT02107963). [141, 150, 238-244]

5.4. Recetores *TRAIL*

Os ligandos indutores de apoptose relacionados com o fator de necrose tumoral (TNF) (*TRAIL*) induzem apoptose especificamente em células tumorais, como as do EWS, mas não em células normais. O anticorpo do *TRAIL*-R2 *lexatumumab* (HGS-ETR2) é agonista deste recetor e induz a apoptose celular de tumores sólidos. No entanto, em estudos clínicos, não foi obtida nenhuma resposta completa ou total, embora tenha havido ligeira diminuição do tamanho tumoral. Num estudo pré-clínico do anticorpo monoclonal agonista do *TRAIL*-R1 *mapatumumab*, nos dois xenoenxertos de EWS testados para este fármaco, houve uma regressão tumoral embora não tenha sido atingida uma resposta objetiva. [141, 245-249]

5.5. *NY-ESO-1*

Genes oncogénicos e da linha germinal (CGG) são expressos em vários tumores, mas não em tecidos normais. Num estudo imunohistoquímico, 11 dos 18 EWS testados para vários CGC mostraram expressão positiva de pelo menos um destes genes, embora em baixa quantidade. O *NY-ESO-1* é um desses genes expresso em alguns EWS, que pode ser um potencial alvo terapêutico. Num ensaio clínico de fase I, os dois doentes com EWS que receberam decitabina (antimetabolito) em combinação com uma vacina de células dendríticas contra os antigénios *MAGE-A1*, *MAGE-3* e *NY-ESO-1*, tiveram progressão da doença, sem qualquer benefício terapêutico. Está a decorrer um ensaio clínico sobre o uso de sirolimus (inibidor mTOR) em combinação com uma vacina de células dendríticas em doentes com tumores sólidos com expressão de *NY-ESO-1* (NCT01522820). [141, 250-252]

6. *STAT3*

O fator de transcrição *STAT3*, ativado quando fosforilado, é necessário para o crescimento celular. No entanto, o aumento da fosforilação deste fator contribui para a tumorigénese, ocorrendo em cerca de 50% das amostras de EWS. O recetor *PTPRD* regula o *STAT3* através da desfosforilação de Y705. Mutações neste recetor, como a mutação *stop* W775, podem levar a uma proteína truncada, levando a acumulação de *STAT3* fosforilado. Num estudo pré-clínico, foi utilizado um oligonucleótido que se liga especificamente ao *STAT3* impedindo a regulação da transcrição subsequente, em xenoenxertos de tumores de cabeça e pescoço, atingindo-se resposta completa em dois dos 10 modelos. Noutro estudo, concluiu-se que o recrutamento de *STAT3* para o IGF-1R é necessário para a fosforilação de *STAT3*, que coloca a hipótese de que

o uso de agentes dirigidos ao STAT3 em combinação com um inibidor do IGF-1R poderá ter um maior potencial terapêutico do que o bloqueio isolado do STAT3. [141, 253-257]

Um inibidor JAK1/2, **AZD1480**, que atua na via de sinalização IL-6/JAK/STAT, mostrou resultados muito promissores em estudos pré-clínicos, tanto em linhagens celulares de vários tumores, incluindo EWS, como em modelos de xenoenxertos. O AZD1480 bloqueia a ativação endógena e induzida por IL-6 do STAT3, diminui a viabilidade celular das linhagens celulares tumorais estudadas, inibe o crescimento celular, e induz a apoptose caspase-dependente, diminui a expressão de genes-alvo do STAT3, que incluem reguladores do ciclo celular, anti-apoptóticos e relacionados com metastização, *in vitro*. *In vivo*, o AZD1480 diminuiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevivência dos ratinhos hospedeiros. Estes dados dão suporte científico para se começar a ponderar iniciar estudos clínicos. [258]

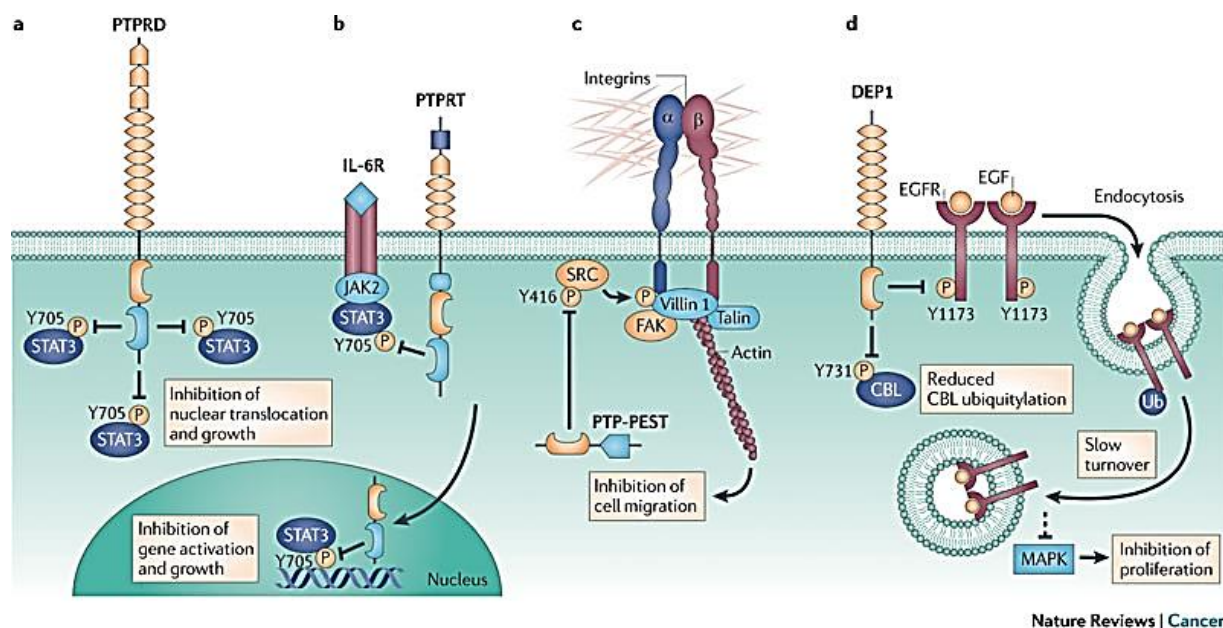


Figura 5 – Mecanismos de supressão tumoral. Retirado de [259].

7. RAF/MEK/ERK

A via RAF/MEK/ERK está envolvida na proliferação celular. Em osteossarcomas, EWS e condrossarcomas de alto grau, a expressão de pMAPK/pERK1/2 está aumentada, pelo que terapêutica dirigida a esta via de sinalização poderá ter efeitos benéficos e ser adjuvante de outras terapêuticas. O **sorafenib**, inibidor da RAF-1 e, portanto, desta via de sinalização, está em estudos clínicos, conforme descrito acima. Outros inibidores têm estudos pré-clínicos: o

PD98059 no osteossarcoma e o **U0126** no EWS. A inibição de IGF-1R, já mencionada acima, também tem efeitos inibitórios nesta via, pelo que a utilização de um inibidor RAF/MEK em combinação com um inibidor IGF-1R poderá ter efeitos sinérgicos. O **Trametinib** é um inibidor MERK1/2 que está a ser estudado num ensaio clínico de fase I/II, em tumores, entre os quais EWS. [150, 260-262]

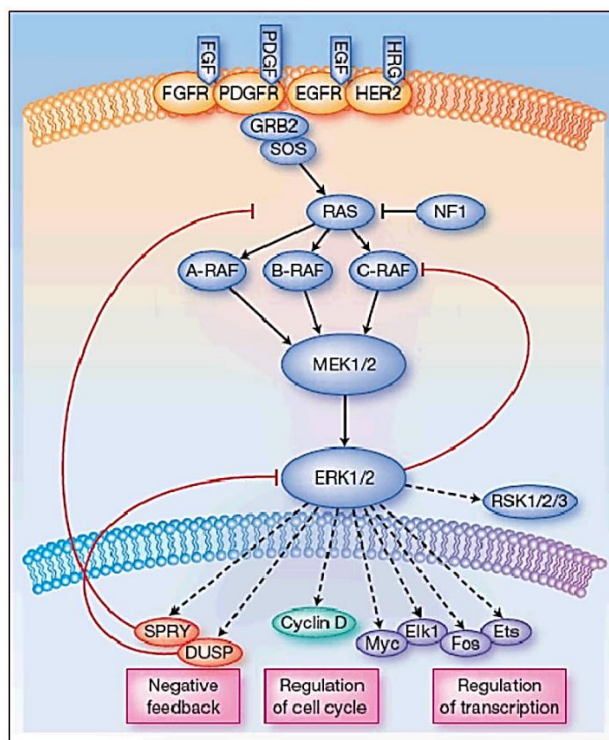


Figura 6 - Via de sinalização RAS/MEK/ERK. Retirado de [263]

8. Via PI3K/Akt

Nos sarcomas ósseos e de tecidos moles, frequentemente há uma expressão aumentada de Akt fosforilado, pela sobreexpressão do IGF-1R. Além disso, a sinalização através de Akt tem sido ligada a resistência a inibidores de IGF-1R e de mTOR. Assim, terapêutica dirigida à via PI3K/Akt poderá ter efeitos benéficos. O inibidor de PI3K **buparlisib** (BKM120) mostrou actividade *in vitro* em sarcomas ósseos e de tecidos moles, através da inibição de Akt e da sinalização a jusante de mTOR em linhagens celulares de osteossarcoma, EWS e rabdomiossarcoma. Além da citotoxicidade demonstrada como agente isolado, mostrou-se também que o buparlisib é mais eficaz quando usado em combinação com o inibidor IGF-1R **NVP-AEW541** e com o inibidor mTOR **rapamicina** (sirolimus). A utilização de buparlisib com o inibidor MEK1/2 **trametinib** mostrou sinergia de ação em sarcomas com mutação da via da MAPK. [264]

9. *Histona desacetilases (HDAC)*

O **vorinostat** é um inibidor oral das histona desacetilases, enzimas que estão envolvidas na regulação epigenética da expressão gênica. Este inibidor promove a apoptose celular em modelos animais de meduloblastoma. Os testes pré-clínicos em tumores pediátricos sólidos e na leucemia aguda linfoblástica não mostraram resposta objetiva, o que sugeriu que este inibidor usado isoladamente não seria suficiente para o tratamento destes tumores. No entanto, o uso de vorinostat em combinação com outros fármacos poderá ter potencial terapêutico e aumentar a sua eficácia. Num estudo *in vitro*, foi avaliada a eficácia de vorinostat com o agente alquilante temozolomida em combinações sequenciais e simultâneas. Demonstrou-se que a citotoxicidade era superior quando a temozolomida era administrada antes do vorinostat. Nas combinações utilizadas, ocorre subregulação da ciclina D1, levando a paragem do ciclo celular em G0/G1, e promoção da apoptose celular por clivagem da caspase-3 e da PARP. Quando a temozolomida é administrada antes ou concomitantemente com o vorinostat, ocorre ativação de STAT3, MAPK e da via p53. Por outro lado, quando o vorinostat é administrado primeiro, ocorre reparação de ADN, aumento da fosforilação do AKT e reduzida acetilação H2B. Noutro estudo *in vitro*, mostrou-se que a eficácia do etoposido era superior se houvesse um tratamento prévio com vorinostat. Este estudo também mostrou que o vorinostat tem um efeito antagonista da doxorrubicina e do topotecano, diminuindo a sua eficácia. [265, 266]

10. *Bromodomínio BET*

As proteínas BET (BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT) pertencem a um subgrupo de proteínas BRD. São proteínas nucleares que contêm dois domínios bromo- e um domínio adicional ET e estão associadas a complexos de transcrição e a cromatina acetilada. Inibidores específicos das proteínas BET (e. g. I-BET151, JQ1) levam a disjunção das BRD da cromatina e inibição da transcrição de genes-alvo, tais como BCL2, MYC e CDK6. O **JQ1** consegue bloquear o crescimento de um carcinoma pavimentoso com a translocação BRD4-NUT e de mieloma múltiplo com transformação MYC. A efetividade do JQ1 foi também demonstrada para leucemia mieloide crónica. Também se demonstrou que a atividade da via PI3K está ligada à renovação de MYC e pode potencialmente aumentar a atividade dos inibidores BET. Num estudo recente, demonstrou-se que o uso de JQ1 provocou uma forte subregulação da proteína EWS-FLI1, aumentando a apoptose celular das células tratadas. Este efeito foi aumentado pelo co-tratamento com um inibidor de PI3K. Em modelos de xenoenxertos, o uso deste tratamento também provocou inibição do crescimento tumoral. [267-276]

11. Saponina TTB2

A saponina esteroide TTB2 pode ser isolada a partir de extratos de *Trillium tschonoskii* Maxim, uma erva medicinal utilizada em tratamentos de medicina tradicional chinesa para vários fins. Os seus mecanismos e efeitos farmacológicos não são ainda completamente conhecidos. Num estudo recente, foi utilizada esta saponina em linhagens celulares de EWS, que demonstrou inibição do crescimento celular e paragem do ciclo celular nas fases G2/M e S, dependente de dose e de tempo de exposição. Também se demonstrou que a fosforilação de cinases reguladas por sinais extracelulares foram inibidas por este fármaco. Neste estudo pré-clínico demonstraram-se assim algumas propriedades antitumorais e o potencial terapêutico de TTB2. [277]

12. Cicloxigenase 2 (COX-2)

Nos tumores sólidos, ocorre hipoxia, que é um dos estímulos mais potentes para a expressão de VEGF, efeito este mediado pelo fator indutor de hipoxia-1 (HIF-1), regulador major da angiogénese neste contexto. O HIF-1 induz a via da COX-2 em situações de hipoxia. A hipoxia pode também sobreregular esta via através de mecanismos independentes de HIF-1, como por exemplo, através do NF- κ B. A COX-2 pode ainda ser induzida pelo RAS, através da cinase Rac/c-Jun-NH2 que fosforila c-Jun (*activator protein-1*), e da Raf cinase que ativa CCAAT/*enhancer binding protein* β , e/ou do Ets fator de transcrição PEA3, todos reguladores da expressão de COX-2. [278]

A via COX-2 tem efeitos pró-angiogénicos através da indução da prostaglandina E2 (PGE2), que pode atuar através do HIF-1 ou de mecanismos independentes (ex. PI3K/Akt) que aumentem o VEGF. Pode ainda induzir a quimiocina pró-angiogénica CXCL1 e a angiopoietina-1 (proteína envolvida na remodelação vascular). A via PI3K/Akt/mTOR aumenta a expressão de IL-1, que por sua vez induz a ativação de NF κ B e do HIF-1. [278, 279]

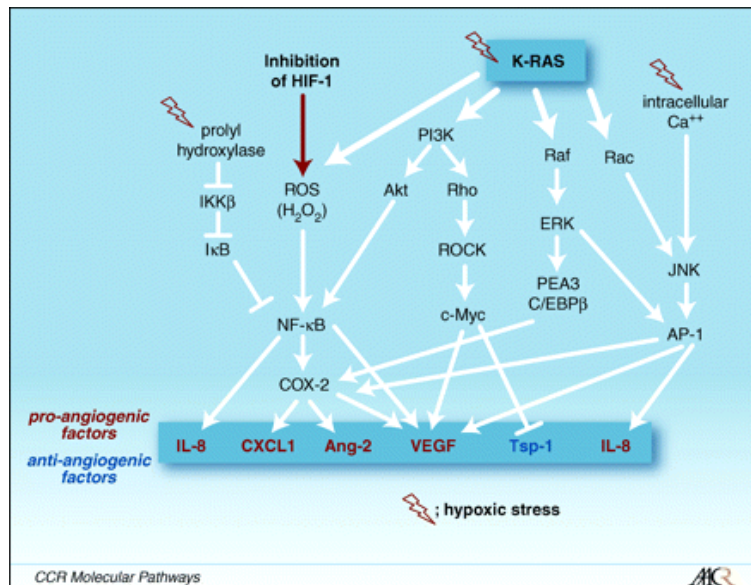


Figura 7 - Vias de transdução de sinal que podem estimular a angiogênese independentemente do HIF-1. Retirado de [278].

O uso de baixas doses de rapamicina (inibidor mTOR) mostrou inibir o crescimento tumoral pela inibição da neovascularização. O bloqueio de mTOR também mostrou diminuir a expressão de COX-2 *in vivo* em rins saudáveis. [280]

O **celecoxib** (inibidor seletivo da COX-2) usado isoladamente ou em associação com rapamicina mostrou prevenir o aparecimento de metástases pulmonares em modelos murinos de EWS, sem efeito no crescimento tumoral nem na neovascularização. Noutro estudo, o uso de celecoxib *in vitro* e *in vivo* mostrou inibir a invasão de tecidos por células de EWS, mas este efeito não foi revertido pela adição de PGE2, nem se verificou esta inibição com o uso de rofecoxib, um inibidor mais seletivo de COX-2. Estes achados apontam para um mecanismo do celecoxib de inibição da invasão e metastização das células de EWS independente da COX-2. Noutro estudo mais recente, mostrou-se que o celecoxib não exerce o seu efeito antimetastático pela alteração da regulação da β -catenina mas exerce efeitos importantes de modulação da actina do citoesqueleto, propondo este como o mecanismo de ação. [281-283]

Num ensaio clínico de fase 2, foi administrado celecoxib e vinblastina em adição a um regime de quimioterapia VDC-IE a 35 doentes com EWS metastizado recentemente diagnosticado. A toxicidade observada foi sobreponível com a do tratamento corrente para o EWS. Não se demonstrou vantagem na sobrevida global mas sim na sobrevida livre de eventos a 2 anos em doentes com metástases pulmonares apenas, em comparação com registos anteriores (71% vs. 31/36%). No entanto, são necessários mais estudos com maior número de doentes e mais tempo de seguimento. [284]

Discussão/Conclusões

O EWS tem verificado uma melhoria muito significativa da sobrevida nas últimas décadas, com a introdução de novas técnicas cirúrgicas e de novos fármacos e esquemas terapêuticos de quimioterapia.

Em relação ao tratamento local, não existem ensaios clínicos aleatorizados que comparem diretamente o uso de radioterapia com o uso de cirurgia ou de ambos e os estudos que existem têm, na maioria das vezes, um viés de seleção, que compromete as conclusões. No entanto, sabe-se que as diferentes técnicas de controlo local têm vantagens e efeitos adversos que podem variar bastante com fatores do doente e do próprio tumor. Assim, a escolha do tipo de tratamento tem de ter em conta a esperança média de vida do doente, o ganho de quantidade e de qualidade de vida com a intervenção, e o custo funcional que poderá acarretar. Em tumores de menor dimensão, com estadios TNM inferiores, a radioterapia ou a cirurgia isoladamente poderão ser eficazes. No entanto, nos tumores maiores, com envolvimento loco-regional e invasão de estruturas vizinhas, a combinação destes dois métodos, em particular o uso de radioterapia e também de quimioterapia neoadjuvante, que permita uma excisão cirúrgica mais segura, é muitas vezes o mais adequado. Em relação aos casos de EWS metastático, o controlo local tem um papel no prognóstico, seja através de excisão cirúrgica de metástases extrapulmonares ou de irradiação das metástases pulmonares, em casos selecionados.

O tratamento do EWS envolve sempre terapêutica sistémica, com quimioterapia, tendo sido este o fator que mais contribuiu para o aumento da sobrevivência nas últimas décadas, ainda que esta se mantenha baixa. Atualmente, resumindo, os centros norte-americanos utilizam principalmente o esquema VDC-IE, com intervalos de 2 semanas, e as instituições europeias têm usado como quimioterapia de indução o esquema VIDE (6 ciclos de VIDE, seguidos de 1 ciclo VAI e 7 ciclos VAC). Pretende-se que o estudo EURO-EWING 2012 venha a mostrar qual destes dois esquemas terá melhores resultados a nível de sobrevida global e de sobrevida livre de eventos e de recorrência. No entanto, este estudo ainda está a decorrer, pelo que apenas dentro de alguns anos se poderá usar os resultados deste estudo para guiar a escolha terapêutica. O uso de agentes em doses elevadas, especialmente agentes alquilantes como o melfalano e o bussulfano, em combinação com quimioterapia em doses convencionais, seguido de transplante de células estaminais hematopoiéticas, também poderá ter benefício, principalmente em

doentes com doença metastática extrapulmonar, mas aguardam-se resultados de estudos multicêntricos de larga escala.

Em relação aos novos fármacos, vários alvos terapêuticos têm sido identificados e o seu número continua a crescer. Os fármacos anti-IGF-1R têm mostrado resultados promissores, e também se em combinação com inibidores de mTOR. O bloqueio duplo desta via de sinalização parece vencer resistências a cada um dos fármacos e obter melhores resultados em termos de resposta tumoral. Os ensaios clínicos com estes fármacos estão, no geral, em fase II, mas ainda em recrutamento.

Os inibidores de tirosina cinases estão a ser estudados em ensaios clínicos, tanto em combinação com quimioterapia como isoladamente, ou ainda com outros anticorpos contra outros alvos terapêuticos. Alguns destes fármacos têm mostrado resposta tumoral, mas aguardam-se ensaios com maior número de doentes.

Os estudos fármacos contra alvos moleculares relacionados com a expressão de EWS-FLI1 estão ainda em fases mais iniciais, a maioria apenas com estudos pré-clínicos completos. Os inibidores da PARP são os mais estudados, com ensaios clínicos de fase II, em que parece haver vantagem no uso em combinação com esquemas de quimioterapia que incluam temozolomida. Muitos outros fármacos e respetivos alvos terapêuticos estão a ser estudados, mas ainda em fase pré-clínica. Em relação ao celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, os resultados pré-clínicos eram promissores, mas no ensaio clínico de fase II em doentes com EWS, a resposta foi sobreponível ao tratamento convencional. No entanto, foram usados controlos históricos, pelo que com mais estudos poderá vir a demonstrar-se vantagem na utilização deste fármaco.

Nos estudos clínicos de vários dos fármacos referidos, a resposta tumoral foi parcial ou completa em alguns doentes e nula noutros. Isto levantou a questão de existirem fatores que condicionem a atuação do fármaco no tumor, como por exemplo, a expressão elevada ou diminuída de algum produto da cascata de sinalização sobre a qual incide o fármaco, ou presença de anticorpos antifármaco, ou ainda polimorfismos somáticos do indivíduo. Neste sentido, em alguns estudos, tentou-se identificar algum biomarcador preditivo de resposta terapêutica, ainda sem sucesso. Provavelmente, o uso do fármaco em estudo em amostras maiores de doentes com EWS e com diferentes características clínicopatológicas poderá vir a permitir descobrir fatores associados a boa ou má resposta à terapêutica.

Uma das limitações dos estudos com estes novos fármacos é o facto de muitos deles serem feitos em populações de doentes com tumores ou sarcomas diferentes, o que diminui o número

real de casos de EWS estudados. Assim, é mais difícil avaliar a eficácia de um determinado fármaco, o que pode fazer excluir opções terapêuticas, com base em baixas taxas de resposta que na realidade seriam mais elevadas em populações de doentes com EWS.

Apesar de a sobrevida dos doentes ter aumentado com a introdução de quimioterapia em relação ao uso isolado de tratamento local, a verdade é que nos últimos anos, a sobrevida tem-se mantido igual, principalmente na doença avançada, que uma parte considerável dos doentes apresenta na altura do diagnóstico. Em conclusão, o EWS necessita ainda de bastante investigação em relação ao tratamento, principalmente à terapêutica sistémica, seja quimioterapia, seja terapêutica dirigida a alvos moleculares específicos. E provavelmente, não será um destes fármacos isoladamente a aumentar significativamente a sobrevida do EWS, mas sim combinações otimizadas de vários destes fármacos com alvos diferentes, de quimioterapia e de tratamento local, não esquecendo que o diagnóstico precoce poderá ser o fator com maior impacto.

Agradecimentos

À minha família, em especial, aos meus pais, irmã e avó, pela motivação e apoio incondicional, pelo carinho e paciência, ao longo de todo o meu percurso académico.

À minha orientadora, Dra. Isabel Fernandes, pela disponibilidade, apoio e contribuições valiosas para o trabalho.

Ao Professor Luís Costa e demais equipa do Serviço de Oncologia Médica do Hospital de Santa Maria, assim como, à equipa do laboratório de Oncobiologia Translacional do Instituto de Medicina Molecular, pela oportunidade de realizar estágios nesta área, os quais tiveram uma contribuição decisiva na minha escolha da área médica em que queria realizar o Trabalho Final de Mestrado.

À Professora Isabel Fonseca e à Dra. Filipa Santos do Instituto Português de Oncologia e à D. Anabela Pirão, do Instituto de anatomia Patológica da FML, pela ajuda e disponibilidade imediata, pelo acesso a bibliografia indispensável a que não teria tido acesso de outro modo.

Aos meus amigos e colegas, pelas inúmeras horas passadas juntos, pelos desabafos, pelas alegrias e risos, pela partilha e pelo apoio, ao longo, não só deste último ano, como ao longo de todo o curso.

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Sarcoma de Ewing	3
Introdução	3
Epidemiologia	4
Clínica	4
Fatores prognósticos	6
Histologia	8
Biologia	8
Caracterização genética e molecular	9
Estadiamento	11
Tratamento	12
Terapêutica local: Radioterapia e Excisão Cirúrgica	13
Terapêutica sistêmica	16
Novos fármacos	20
Discussão/Conclusões	39
Agradecimentos	42
Bibliografia	44

Bibliografia

1. Ozaki, T., *Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article*. J Orthop Sci, 2015. **20**(2): p. 250-63.
2. Agrawal, S., et al., *Case report on Ewing's sarcoma with review of literature*. 2015.
3. Sand, L.G., K. Szuhai, and P.C. Hogendoorn, *Sequencing Overview of Ewing Sarcoma: A Journey across Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Landscapes*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(7): p. 16176-215.
4. Bernstein, M., et al., *Ewing's sarcoma family of tumors: current management*. Oncologist, 2006. **11**(5): p. 503-19.
5. Postel-Vinay, S., et al., *Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma*. Nat Genet, 2012. **44**(3): p. 323-7.
6. Beckingsale, T.B. and C. Shaw, (v) *Epidemiology of bone & soft tissue sarcomas*. Orthopaedics and Trauma, 2015. **29**(3): p. 182-188.
7. Board, P.P.T.E., *Ewing Sarcoma Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002-2015, National Cancer Institute (US): Bethesda (MD).
8. Jawad, M.U., et al., *Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005*. Cancer (0008543X), 2009. **115**(15): p. 3526-3536 11p.
9. Kim, S.Y., M. Tsokos, and L.J. Helman, *Dilemmas associated with congenital ewing sarcoma family tumors*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(1): p. 4-7.
10. van den Berg, H., et al., *Ewing tumors in infants*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(4): p. 761-4.
11. Beck, R., et al., *EWS/FLI-responsive GGAA microsatellites exhibit polymorphic differences between European and African populations*. Cancer Genet, 2012. **205**(6): p. 304-12.
12. Grunewald, T.G., et al., *Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 1073-8.
13. Smith, M.A., et al., *Declining childhood and adolescent cancer mortality*. Cancer, 2014. **120**(16): p. 2497-506.
14. Esiashvili, N., M. Goodman, and R.B. Marcus, Jr., *Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(6): p. 425-30.
15. Potratz, J., et al., *Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art*. Pediatr Hematol Oncol, 2012. **29**(1): p. 1-11.
16. Brasme, J.F., et al., *Time to diagnosis of Ewing tumors in children and adolescents is not associated with metastasis or survival: a prospective multicenter study of 436 patients*. J Clin Oncol, 2014. **32**(18): p. 1935-40.
17. Balamuth, N.J. and R.B. Womer, *Ewing's sarcoma*. The Lancet Oncology, 2010. **11**(2): p. 184-192.
18. Grier, H.E., *The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors*. Pediatr Clin North Am, 1997. **44**(4): p. 991-1004.
19. Fiorenza, F. and L. Jeys, (iii) *Ewing's sarcoma of bone*. Orthopaedics and Trauma, 2010. **24**(5): p. 342-345.
20. Fletcher, C.D.M., Bridge, J.A., Hogendoorn, P., Mertens, F., *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. 4th ed. WHO Classification of Tumours. Vol. 5. 2013, Lyon.

21. Patterson FR, B.S., *Ewing's sarcoma*, in *Orthopaedic knowledge update: musculoskeletal tumors 2.*, S. HS, Editor. 2007, Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons. p. 175-83.
22. Biswas, B., et al., *Evaluation of outcome and prognostic factors in extraosseous Ewing sarcoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2014. **61**(11): p. 1925-31.
23. Biswas, B., et al., *Outcomes and prognostic factors for Ewing-family tumors of the extremities*. *J Bone Joint Surg Am*, 2014. **96**(10): p. 841-9.
24. Biswas, B., et al., *Prognostic factors in head and neck Ewing sarcoma family of tumors*. *Laryngoscope*, 2015. **125**(3): p. E112-7.
25. Cotterill, S.J., et al., *Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(17): p. 3108-14.
26. Bacci, G., et al., *Prognostic factors in non-metastatic Ewing's sarcoma tumor of bone: an analysis of 579 patients treated at a single institution with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1998*. *Acta Oncol*, 2006. **45**(4): p. 469-75.
27. Rodriguez-Galindo, C., et al., *Analysis of prognostic factors in ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital studies*. *Cancer*, 2007. **110**(2): p. 375-84.
28. Hesla, A.C., et al., *Improved Prognosis for Patients with Ewing Sarcoma in the Sacrum Compared with the Innominate Bones: The Scandinavian Sarcoma Group Experience*. *J Bone Joint Surg Am*, 2016. **98**(3): p. 199-210.
29. Ahrens, S., et al., *Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. Cooperative Ewing Sarcoma Study*. *Med Pediatr Oncol*, 1999. **32**(3): p. 186-95.
30. De Ioris, M.A., et al., *Ewing sarcoma of the bone in children under 6 years of age*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53223.
31. Grier, H.E., et al., *Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(8): p. 694-701.
32. Granowetter, L., et al., *Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumors: a Children's Oncology Group Study*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(15): p. 2536-41.
33. Womer, R.B., et al., *Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(33): p. 4148-54.
34. Miser, J.S., et al., *Treatment of metastatic Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of combination ifosfamide and etoposide--a Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Group study*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(14): p. 2873-6.
35. Paulussen, M., et al., *Ewing's tumors with primary lung metastases: survival analysis of 114 (European Intergroup) Cooperative Ewing's Sarcoma Studies patients*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(9): p. 3044-52.
36. Paulussen, M., et al., *Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies*. *Ann Oncol*, 1998. **9**(3): p. 275-81.
37. Ladenstein, R., et al., *Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(20): p. 3284-91.
38. Applebaum, M.A., et al., *Clinical features and outcomes in patients with Ewing sarcoma and regional lymph node involvement*. *Pediatr Blood Cancer*, 2012. **59**(4): p. 617-20.

39. Applebaum, M.A., et al., *Clinical features and outcomes in patients with secondary Ewing sarcoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(4): p. 611-5.
40. Roberts, P., et al., *Ploidy and karyotype complexity are powerful prognostic indicators in the Ewing's sarcoma family of tumors: a study by the United Kingdom Cancer Cytogenetics and the Children's Cancer and Leukaemia Group*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. **47**(3): p. 207-20.
41. Schleiermacher, G., et al., *Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(1): p. 85-91.
42. Przybyl, J., et al., *Gene expression profiling of peripheral blood cells: new insights into Ewing sarcoma biology and clinical applications*. *Med Oncol*, 2014. **31**(8): p. 109.
43. Abudu, A., et al., *Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis*. *Br J Cancer*, 1999. **79**(7-8): p. 1185-9.
44. Lopez-Guerrero, J.A., et al., *Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large series of genetically confirmed Ewing's sarcoma family of tumors*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(5): p. 1139-50.
45. Ozaki, T., et al., *Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in Ewing tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **32**(2): p. 164-71.
46. Scotlandi, K., et al., *Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(13): p. 2209-16.
47. Ahmed, A.A., et al., *Akt and Hippo Pathways in Ewing's Sarcoma Tumors and Their Prognostic Significance*. *J Cancer*, 2015. **6**(10): p. 1005-10.
48. Bramer, J.A., et al., *Do pathological fractures influence survival and local recurrence rate in bony sarcomas?* *Eur J Cancer*, 2007. **43**(13): p. 1944-51.
49. Parham, D.M., et al., *Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior*. *Hum Pathol*, 1999. **30**(8): p. 911-8.
50. Luksch, R., et al., *Prognostic value of clinicopathologic characteristics including neuroectodermal differentiation in osseous Ewing's sarcoma family of tumors in children*. *Tumori*, 1999. **85**(2): p. 101-7.
51. de Alava, E., et al., *EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(4): p. 1248-55.
52. van Doorninck, J.A., et al., *Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(12): p. 1989-94.
53. Le Deley, M.C., et al., *Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(12): p. 1982-8.
54. Paulussen, M., et al., *Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(6): p. 1818-29.
55. Rosito, P., et al., *Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone: a preliminary report of 6 years of experience*. *Cancer*, 1999. **86**(3): p. 421-8.
56. Wunder, J.S., et al., *The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma*. *J Bone Joint Surg Am*, 1998. **80**(7): p. 1020-33.

57. Oberlin, O., et al., *Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study)*. Br J Cancer, 2001. **85**(11): p. 1646-54.
58. Ferrari, S., et al., *Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in patients with Ewing sarcoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(6): p. 364-8.
59. Hawkins, D.S., et al., *[18F]Fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts outcome for Ewing sarcoma family of tumors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8828-34.
60. Denecke, T., et al., *Assessment of histological response of paediatric bone sarcomas using FDG PET in comparison to morphological volume measurement and standardized MRI parameters*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010. **37**(10): p. 1842-53.
61. Lin, P.P., et al., *Chemotherapy response is an important predictor of local recurrence in Ewing sarcoma*. Cancer, 2007. **109**(3): p. 603-11.
62. Ambros, I.M., et al., *MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration*. Cancer, 1991. **67**(7): p. 1886-93.
63. Ozaki, T., et al., *Amplification of MYCL in Atypical Ewing Tumor. Analysis of Metaphase and Microarray Comparative Genomic Hybridization*. Cancer Genomics - Proteomics, 2004. **1**(4): p. 275-282.
64. Nascimento, A.G., et al., *A clinicopathologic study of 20 cases of large-cell (atypical) Ewing's sarcoma of bone*. Am J Surg Pathol, 1980. **4**(1): p. 29-36.
65. Folpe, A.L., et al., *Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(8): p. 1025-33.
66. Olsen, S.H., D.G. Thomas, and D.R. Lucas, *Cluster analysis of immunohistochemical profiles in synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, and Ewing sarcoma*. Mod Pathol, 2006. **19**(5): p. 659-68.
67. Paulussen, M., et al., *Ewing's sarcoma of the bone: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology, 2009. **20**(suppl 4): p. iv140-iv142.
68. Ross, K.A., et al., *The biology of ewing sarcoma*. ISRN Oncol, 2013. **2013**: p. 759725.
69. Lin, P.P., Y. Wang, and G. Lozano, *Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma*. Sarcoma, 2011. **2011**.
70. Toomey, E.C., J.D. Schiffman, and S.L. Lessnick, *Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma*. Oncogene, 2010. **29**(32): p. 4504-16.
71. Cavazzana, A.O., et al., *Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone*. Am J Pathol, 1987. **127**(3): p. 507-18.
72. Suh, C.H., et al., *Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors*. Ultrastruct Pathol, 2002. **26**(2): p. 67-76.
73. Lessnick, S.L., C.S. Dacwag, and T.R. Golub, *The Ewing's sarcoma oncoprotein EWS/FLI induces a p53-dependent growth arrest in primary human fibroblasts*. Cancer Cell, 2002. **1**(4): p. 393-401.
74. Rorie, C.J., et al., *The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1266-77.
75. Hu-Lieskovan, S., et al., *EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4633-44.

76. Teitell, M.A., et al., *EWS/ETS fusion genes induce epithelial and neuroectodermal differentiation in NIH 3T3 fibroblasts*. Lab Invest, 1999. **79**(12): p. 1535-43.
77. Castellero-Trejo, Y., et al., *Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8698-705.
78. Riggi, N., et al., *Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11459-68.
79. Torchia, E.C., S. Jaishankar, and S.J. Baker, *Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells*. Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3464-8.
80. Riggi, N., et al., *EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2176-85.
81. Delattre, O., et al., *The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts*. N Engl J Med, 1994. **331**(5): p. 294-9.
82. Turc-Carel, C., et al., *Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12)*. Cancer Genet Cytogenet, 1988. **32**(2): p. 229-38.
83. Riggi, N. and I. Stamenkovic, *The Biology of Ewing sarcoma*. Cancer Letters, 2007. **254**(1): p. 1-10.
84. Zucman, J., et al., *Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours*. EMBO J, 1993. **12**(12): p. 4481-7.
85. Bailly, R.A., et al., *DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(5): p. 3230-41.
86. Patocs, B., et al., *Multiple splice variants of EWSR1-ETS fusion transcripts co-existing in the Ewing sarcoma family of tumors*. Cell Oncol (Dordr), 2013. **36**(3): p. 191-200.
87. West, D.C., et al., *Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 583-8.
88. Avigad, S., et al., *The predictive potential of molecular detection in the nonmetastatic Ewing family of tumors*. Cancer, 2004. **100**(5): p. 1053-8.
89. Ohali, A., et al., *Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling*. Oncogene, 2004. **23**(55): p. 8997-9006.
90. Cheung, I.Y., et al., *Novel markers of subclinical disease for Ewing family tumors from gene expression profiling*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(23): p. 6978-83.
91. Schaefer, K.L., et al., *Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy*. Eur J Cancer, 2008. **44**(5): p. 699-709.
92. Mackintosh, C., et al., *Iq gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma*. Oncogene, 2012. **31**(10): p. 1287-98.
93. Kovar, H., et al., *The first European interdisciplinary ewing sarcoma research summit*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 54.
94. Brohl, A.S., et al., *The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation*. PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004475.
95. Tirode, F., et al., *Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations*. Cancer Discov, 2014. **4**(11): p. 1342-53.
96. Fagone, P., et al., *Cyclin D1 and Ewing's sarcoma/PNET: A microarray analysis*. Acta Histochem, 2015.

97. Cripe, T.P., *Ewing sarcoma: an eponym window to history*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 457532.
98. James, D.H., Jr. and P. George, *Vincristine in Children with Malignant Solid Tumors*. J Pediatr, 1964. **64**: p. 534-41.
99. Tan, C., et al., *Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia*. Cancer, 1967. **20**(3): p. 333-53.
100. Amaral, A.T., et al., *Trabectedin efficacy in Ewing sarcoma is greatly increased by combination with anti-IGF signaling agents*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(6): p. 1373-82.
101. Cupps, R.E., D.L. Ahmann, and E.H. Soule, *Treatment of pulmonary metastatic disease with radiation therapy and adjuvant actinomycin D. Preliminary observations*. Cancer, 1969. **24**(4): p. 719-23.
102. Womer, R.B., et al., *Granulocyte colony stimulating factor permits dose intensification by interval compression in the treatment of Ewing's sarcomas and soft tissue sarcomas in children*. Eur J Cancer, 2000. **36**(1): p. 87-94.
103. Paulussen, M., et al., *Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment--cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients*. J Clin Oncol, 2008. **26**(27): p. 4385-93.
104. Choi, Y., et al., *Role of Radiotherapy in the Multimodal Treatment of Ewing Sarcoma Family Tumors*. Cancer Res Treat, 2015. **47**(4): p. 904-12.
105. Dunst, J., et al., *Radiation therapy as local treatment in Ewing's sarcoma. Results of the Cooperative Ewing's Sarcoma Studies CESS 81 and CESS 86*. Cancer, 1991. **67**(11): p. 2818-25.
106. Rombi, B., et al., *Proton radiotherapy for pediatric tumors: review of first clinical results*. Ital J Pediatr, 2014. **40**: p. 74.
107. Wagner, T.D., et al., *Combination short-course preoperative irradiation, surgical resection, and reduced-field high-dose postoperative irradiation in the treatment of tumors involving the bone*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **73**(1): p. 259-66.
108. DuBois, S.G., et al., *Comparative evaluation of local control strategies in localized Ewing sarcoma of bone: a report from the Children's Oncology Group*. Cancer, 2015. **121**(3): p. 467-75.
109. Haeusler, J., et al., *The value of local treatment in patients with primary, disseminated, multifocal Ewing sarcoma (PDMES)*. Cancer, 2010. **116**(2): p. 443-50.
110. Burdach, S., et al., *Total body MRI-governed involved compartment irradiation combined with high-dose chemotherapy and stem cell rescue improves long-term survival in Ewing tumor patients with multiple primary bone metastases*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(3): p. 483-9.
111. Paulino, A.C., W.Y. Mai, and B.S. Teh, *Radiotherapy in metastatic ewing sarcoma*. Am J Clin Oncol, 2013. **36**(3): p. 283-6.
112. Casey, D.L., et al., *Radiation for bone metastases in Ewing sarcoma and rhabdomyosarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2015. **62**(3): p. 445-9.
113. Brown, L.C., et al., *Stereotactic body radiotherapy for metastatic and recurrent ewing sarcoma and osteosarcoma*. Sarcoma, 2014. **2014**: p. 418270.
114. Leavey, P.J., et al., *Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: A report from the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **51**(3): p. 334-8.

115. Stahl, M., et al., *Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **57**(4): p. 549-53.
116. Barker, L.M., et al., *Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(19): p. 4354-62.
117. Bacci, G., et al., *Pattern of relapse in 290 patients with nonmetastatic Ewing's sarcoma family tumors treated at a single institution with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1999*. *Eur J Surg Oncol*, 2006. **32**(9): p. 974-9.
118. Rodriguez-Galindo, C., et al., *Survival after recurrence of Ewing tumors: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1979-1999*. *Cancer*, 2002. **94**(2): p. 561-9.
119. Gaspar, N., et al., *Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(27): p. 3036-46.
120. Rosen, G., *Progress in the treatment of Ewing sarcoma: are the rumors of the demise of cytotoxic chemotherapy premature?* *Klin Padiatr*, 2015. **227**(3): p. 105-7.
121. Nesbit, M.E., Jr., et al., *Multimodal therapy for the management of primary, nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone: an Intergroup Study*. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1981(56): p. 255-62.
122. Burgert, E.O., Jr., et al., *Multimodal therapy for the management of nonpelvic, localized Ewing's sarcoma of bone: intergroup study IEES-II*. *J Clin Oncol*, 1990. **8**(9): p. 1514-24.
123. Le Deley, M.C., et al., *Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(23): p. 2440-8.
124. Magnan, H., et al., *Ifosfamide dose-intensification for patients with metastatic Ewing sarcoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(4): p. 594-7.
125. Brunetto, A.L., et al., *Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(10): p. 1747-53.
126. Mascarenhas, L., et al., *Pilot Study of Adding Vincristine, Topotecan, and Cyclophosphamide to Interval-Compressed Chemotherapy in Newly Diagnosed Patients With Localized Ewing Sarcoma: A Report From the Children's Oncology Group*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015.
127. Odri, G.A., et al., *Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients*. *Cancer Res*, 2010. **70**(19): p. 7610-9.
128. Dos Santos, M.P., et al., *In vitro antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: a paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma*. *Oncol Rep*, 2014. **31**(2): p. 955-68.
129. Odri, G., et al., *Zoledronic acid inhibits pulmonary metastasis dissemination in a preclinical model of Ewing's sarcoma via inhibition of cell migration*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 169.
130. Burdach, S., et al., *High-dose therapy for patients with primary multifocal and early relapsed Ewing's tumors: results of two consecutive regimens assessing the role of total-body irradiation*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(16): p. 3072-8.
131. Kushner, B.H. and P.A. Meyers, *How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(3): p. 870-80.
132. Marina, N. and P.A. Meyers, *High-dose therapy and stem-cell rescue for Ewing's family of tumors in second remission*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(19): p. 4262-4.

133. McTiernan, A., et al., *High dose chemotherapy with bone marrow or peripheral stem cell rescue is an effective treatment option for patients with relapsed or progressive Ewing's sarcoma family of tumours*. Ann Oncol, 2006. **17**(8): p. 1301-5.
134. Meyers, P.A., et al., *High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis*. J Clin Oncol, 2001. **19**(11): p. 2812-20.
135. Burdach, S., *Treatment of advanced Ewing tumors by combined radiochemotherapy and engineered cellular transplants*. Pediatr Transplant, 2004. **8 Suppl 5**: p. 67-82.
136. Oberlin, O., et al., *Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumors: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant*. J Clin Oncol, 2006. **24**(24): p. 3997-4002.
137. Gaspar, N., et al., *Risk adapted chemotherapy for localised Ewing's sarcoma of bone: the French EW93 study*. Eur J Cancer, 2012. **48**(9): p. 1376-85.
138. Drabko, K., et al., *Consolidation of first-line therapy with busulphan and melphalan, and autologous stem cell rescue in children with Ewing's sarcoma*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(12): p. 1530-4.
139. Thiel, U., et al., *No improvement of survival with reduced- versus high-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplants in Ewing tumor patients*. Ann Oncol, 2011. **22**(7): p. 1614-21.
140. Jahnukainen, K., et al., *High-dose Thiotepa as Consolidation Therapy With Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for High-risk Ewing Family Tumors: Single-institution Experience*. J Pediatr Hematol Oncol, 2015. **37**(7): p. 536-42.
141. Jiang, Y., J. Ludwig, and F. Janku, *Targeted therapies for advanced Ewing sarcoma family of tumors*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(5): p. 391-400.
142. Garofalo, C., et al., *Efficacy of and resistance to anti-IGF-1R therapies in Ewing's sarcoma is dependent on insulin receptor signaling*. Oncogene, 2011. **30**(24): p. 2730-2740.
143. Laplante, M. and David M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth Control and Disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-293.
144. Toretsky, J.A., et al., *The Insulin-like Growth Factor-I Receptor Is Required for EWS/FLI-1 Transformation of Fibroblasts*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(49): p. 30822-30827.
145. Scotlandi, K., et al., *Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4570-4.
146. Kang, H.-G., et al., *Inhibition of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor by Epigallocatechin Gallate Blocks Proliferation and Induces the Death of Ewing Tumor Cells*. Molecular Cancer Therapeutics, 2010. **9**(5): p. 1396-1407.
147. Manara, M.C., et al., *Preclinical in vivo study of new insulin-like growth factor-I receptor--specific inhibitor in Ewing's sarcoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1322-30.
148. Scotlandi, K., et al., *Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice*. Cancer Res, 1998. **58**(18): p. 4127-31.
149. Juergens, H., et al., *Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma*. J Clin Oncol, 2011. **29**(34): p. 4534-40.
150. NIH, U., *ClinicalTrials.gov*. 2015.

151. Olmos, D., et al., *Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study*. The Lancet Oncology, 2010. **11**(2): p. 129-135.
152. Cohen, B.D., et al., *Combination Therapy Enhances the Inhibition of Tumor Growth with the Fully Human Anti-Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody CP-751,871*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(5): p. 2063-2073.
153. Wagner, L.M., et al., *Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer, 2015. **62**(3): p. 440-4.
154. Weigel, B., et al., *Phase 2 trial of cixutumumab in children, adolescents, and young adults with refractory solid tumors: a report from the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer, 2014. **61**(3): p. 452-6.
155. Naing, A., et al., *Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(9): p. 2625-31.
156. Rowinsky, E.K., et al., *IMC-A12, a human IgG1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(18 Pt 2): p. 5549s-5555s.
157. Tap, W.D., et al., *Phase II study of ganitumab, a fully human anti-type-1 insulin-like growth factor receptor antibody, in patients with metastatic Ewing family tumors or desmoplastic small round cell tumors*. J Clin Oncol, 2012. **30**(15): p. 1849-56.
158. Tolcher, A.W., et al., *Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG 479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1*. J Clin Oncol, 2009. **27**(34): p. 5800-7.
159. Calzone, F., et al., *Domain-specific mechanisms of receptor inhibition by AMG 479, a fully-human IGF1R targeted antibody*. Cancer Research, 2008. **68**(9 Supplement): p. 3994.
160. Pappo, A.S., et al., *R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors: results of a phase II Sarcoma Alliance for Research through Collaboration study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(34): p. 4541-7.
161. Kurzrock, R., et al., *A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-I receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(8): p. 2458-65.
162. Mulvihill, M.J., et al., *Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor*. Future Med Chem, 2009. **1**(6): p. 1153-71.
163. Kolb, E.A., et al., *Initial testing (stage 1) of the IGF-1 receptor inhibitor BMS-754807 by the pediatric preclinical testing program*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(4): p. 595-603.
164. Martins, A.S., et al., *Insulin-like growth factor I receptor pathway inhibition by ADW742, alone or in combination with imatinib, doxorubicin, or vincristine, is a novel therapeutic approach in Ewing tumor*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3532-40.
165. Arcaro, A., *Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer*. Frontiers in Pharmacology, 2013. **4**: p. 30.
166. Garofalo, C., et al., *Identification of common and distinctive mechanisms of resistance to different anti-IGF-1R agents in Ewing's sarcoma*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(9): p. 1603-16.
167. Zhao, Q., et al., *A dual-specific anti-IGF-1/IGF-2 human monoclonal antibody alone and in combination with temsirolimus for therapy of neuroblastoma*. Int J Cancer, 2015. **137**(9): p. 2243-52.

168. Janku, F., *Bringing target-matched PI3King from the bench to the clinic*. Cell Cycle, 2013. **12**(12): p. 1817-1818.
169. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
170. Mita, M.M., et al., *Phase I Trial of the Novel Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Deforolimus (AP23573; MK-8669) Administered Intravenously Daily for 5 Days Every 2 Weeks to Patients With Advanced Malignancies*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(3): p. 361-367.
171. Mita, M.M., J. Gong, and S.P. Chawla, *Ridaforolimus in advanced or metastatic soft tissue and bone sarcomas*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2013. **6**(5): p. 465-82.
172. Elit, L., *Drug evaluation: AP-23573--an mTOR inhibitor for the treatment of cancer*. IDrugs, 2006. **9**(9): p. 636-44.
173. Rivera, V.M., et al., *Ridaforolimus (AP23573; MK-8669), a potent mTOR inhibitor, has broad antitumor activity and can be optimally administered using intermittent dosing regimens*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(6): p. 1059-71.
174. Bagatell, R., et al., *Phase 1 trial of temsirolimus in combination with irinotecan and temozolomide in children, adolescents and young adults with relapsed or refractory solid tumors: A children's oncology group study*. Pediatric Blood & Cancer, 2014. **61**(5): p. 833-839.
175. Wagner, L.M., et al., *Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma*. Pediatric Blood & Cancer, 2007. **48**(2): p. 132-139.
176. Naing, A., et al., *Insulin Growth Factor-Receptor (IGF-1R) Antibody Cixutumumab Combined with the mTOR Inhibitor Temsirolimus in Patients with Refractory Ewing's Sarcoma Family Tumors*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(9): p. 2625-2631.
177. Schwartz, G.K., et al., *Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial*. The Lancet Oncology, 2013. **14**(4): p. 371-382.
178. Demetri, G.D., et al., *Results of an International Randomized Phase III Trial of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Ridaforolimus Versus Placebo to Control Metastatic Sarcomas in Patients After Benefit From Prior Chemotherapy*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(19): p. 2485-2492.
179. Dancey, J., *mTOR signaling and drug development in cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(4): p. 209-19.
180. Wan, X., et al., *Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism*. Oncogene, 2006. **26**(13): p. 1932-1940.
181. Kurmasheva, R.T., et al., *The Insulin-like Growth Factor-1 Receptor--Targeting Antibody, CP-751,871, Suppresses Tumor-Derived VEGF and Synergizes with Rapamycin in Models of Childhood Sarcoma*. Cancer Research, 2009. **69**(19): p. 7662-7671.
182. Subbiah, V., et al., *Targeted morphoproteomic profiling of Ewing's sarcoma treated with insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) inhibitors: response/resistance signatures*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18424.
183. Corless, C.L., C.M. Barnett, and M.C. Heinrich, *Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(12): p. 865-78.
184. Bozzi, F., et al., *Evidence for activation of KIT, PDGFR α , and PDGFR β receptors in the Ewing sarcoma family of tumors*. Cancer, 2007. **109**(8): p. 1638-1645.
185. Heinrich, M.C., et al., *Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor*. Blood, 2000. **96**(3): p. 925-32.

186. Bond, M., et al., *A phase II study of imatinib mesylate in children with refractory or relapsed solid tumors: A Children's Oncology Group study*. Pediatric Blood & Cancer, 2008. **50**(2): p. 254-258.
187. Wilhelm, S.M., et al., *Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity*. International Journal of Cancer, 2011. **129**(1): p. 245-255.
188. Schittenhelm, M.M., et al., *Dasatinib (BMS-354825), a Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor, Inhibits the Kinase Activity of Wild-Type, Juxtamembrane, and Activation Loop Mutant KIT Isoforms Associated with Human Malignancies*. Cancer Research, 2006. **66**(1): p. 473-481.
189. Weber, J., *Review: Anti-CTLA-4 Antibody Ipilimumab: Case Studies of Clinical Response and Immune-Related Adverse Events*. The Oncologist, 2007. **12**(7): p. 864-872.
190. Steelman, L.S., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging*. Aging (Albany NY), 2011. **3**(3): p. 192-222.
191. Baselga, J., *Targeting the epidermal growth factor receptor with tyrosine kinase inhibitors: small molecules, big hopes*. J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2217-9.
192. Wakeling, A.E., et al., *ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy*. Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5749-54.
193. Lynch, T.J., et al., *Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(21): p. 2129-2139.
194. Paez, J.G., et al., *EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy*. Science, 2004. **304**(5676): p. 1497-1500.
195. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(36): p. 13306-13311.
196. Jimeno, A., et al., *Analysis of biologic surrogate markers from a Children's Oncology Group Phase I trial of gefitinib in pediatric patients with solid tumors*. Pediatric Blood & Cancer, 2007. **49**(3): p. 352-357.
197. Cappuzzo, F., et al., *Akt Phosphorylation and Gefitinib Efficacy in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2004. **96**(15): p. 1133-1141.
198. Daw, N.C., et al., *Phase I and Pharmacokinetic Study of Gefitinib in Children With Refractory Solid Tumors: A Children's Oncology Group Study*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(25): p. 6172-6180.
199. Sitohy, B., J.A. Nagy, and H.F. Dvorak, *Anti-VEGF/VEGFR Therapy for Cancer: Reassessing the Target*. Cancer Research, 2012. **72**(8): p. 1909-1914.
200. Dalal, S., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor: A Therapeutic Target for Tumors of the Ewing's Sarcoma Family*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(6): p. 2364-2378.
201. Wedge, S.R., et al., *AZD2171: A Highly Potent, Orally Bioavailable, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer*. Cancer Research, 2005. **65**(10): p. 4389-4400.
202. Fox, E., et al., *A Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Cediranib, an Orally Bioavailable Pan-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibitor, in Children and Adolescents With Refractory Solid Tumors*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(35): p. 5174-5181.

203. Wagner, L., et al., *Pilot study of vincristine, oral irinotecan, and temozolomide (VOIT regimen) combined with bevacizumab in pediatric patients with recurrent solid tumors or brain tumors.* *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(9): p. 1447-51.
204. Attia, S., et al., *Clinical Activity of Pazopanib in Metastatic Extraosseous Ewing Sarcoma.* *Rare Tumors*, 2015. **7**(2): p. 5992.
205. Schutz, F.A., T.K. Choueiri, and C.N. Sternberg, *Pazopanib: Clinical development of a potent anti-angiogenic drug.* *Crit Rev Oncol Hematol*, 2011. **77**(3): p. 163-71.
206. Alcindor, T., *Response of refractory Ewing sarcoma to pazopanib.* *Acta Oncol*, 2015. **54**(7): p. 1063-4.
207. Yamamoto, Y., et al., *Pazopanib for recurrent extraosseous Ewing's sarcoma of the retroperitoneum.* *Int J Urol*, 2014. **21**(11): p. 1183-4.
208. Wilhelm, S.M., et al., *BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.* *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7099-109.
209. Raut, C.P., et al., *Effects of sorafenib on intra-tumoral interstitial fluid pressure and circulating biomarkers in patients with refractory sarcomas (NCI protocol 6948).* *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e26331.
210. Schneider, B.P., et al., *Association of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Genetic Polymorphisms With Outcome in a Trial of Paclitaxel Compared With Paclitaxel Plus Bevacizumab in Advanced Breast Cancer: ECOG 2100.* *Journal of Clinical Oncology*, 2008. **26**(28): p. 4672-4678.
211. Meyer, R.D., M. Mohammadi, and N. Rahimi, *A Single Amino Acid Substitution in the Activation Loop Defines the Decoy Characteristic of VEGFR-1/FLT-1.* *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(2): p. 867-875.
212. Duda, D.G., et al., *Plasma Soluble VEGFR-1 Is a Potential Dual Biomarker of Response and Toxicity for Bevacizumab with Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer.* *The Oncologist*, 2010. **15**(6): p. 577-583.
213. von Bubnoff, N., et al., *FMS-Like Tyrosine Kinase 3-Internal Tandem Duplication Tyrosine Kinase Inhibitors Display a Nonoverlapping Profile of Resistance Mutations In vitro.* *Cancer Research*, 2009. **69**(7): p. 3032-3041.
214. Bonin, G., et al., *Chimeric EWS-FLII transcript in a Ewing cell line with a complex t(11;22;14) translocation.* *Cancer Res*, 1993. **53**(16): p. 3655-7.
215. May, W.A., et al., *Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLII for transformation.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(12): p. 5752-6.
216. Siligan, C., et al., *EWS-FLII target genes recovered from Ewing's sarcoma chromatin.* *Oncogene*, 2005. **24**(15): p. 2512-24.
217. Toretsky, J.A., et al., *Oncoprotein EWS-FLII Activity Is Enhanced by RNA Helicase A.* *Cancer Research*, 2006. **66**(11): p. 5574-5581.
218. Barber-Rotenberg, J.S., et al., *Single Enantiomer of YK-4-279 Demonstrates Specificity in Targeting the Oncogene EWS-FLII.* 2012. Vol. 3. 2012.
219. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *An Oral Formulation of YK-4-279: Preclinical Efficacy and Acquired Resistance Patterns in Ewing Sarcoma.* *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(7): p. 1591-604.
220. Carmena, M., S. Ruchaud, and W.C. Earnshaw, *Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins.* *Current Opinion in Cell Biology*, 2009. **21**(6): p. 796-805.

221. Winter, G.E., et al., *An Integrated Chemical Biology Approach Identifies Specific Vulnerability of Ewing's Sarcoma to Combined Inhibition of Aurora Kinases A and B*. Molecular Cancer Therapeutics, 2011. **10**(10): p. 1846-1856.
222. Wakahara, K., et al., *EWS-Flt1 Up-Regulates Expression of the Aurora A and Aurora B Kinases*. Molecular Cancer Research, 2008. **6**(12): p. 1937-1945.
223. Maris, J.M., et al., *Initial testing of the aurora kinase A inhibitor MLN8237 by the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP)*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(1): p. 26-34.
224. Grohar, P.J., et al., *Ecteinascidin 743 interferes with the activity of EWS-FLI1 in Ewing sarcoma cells*. Neoplasia, 2011. **13**(2): p. 145-53.
225. Di Giandomenico, S., et al., *Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas*. Oncogene, 2014. **33**(44): p. 5201-10.
226. De Sanctis, R., et al., *Efficacy of trabectedin in advanced soft tissue sarcoma: beyond lipo- and leiomyosarcoma*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 5785-91.
227. DuBois, S.G., et al., *Phase II study of intermediate-dose cytarabine in patients with relapsed or refractory Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(3): p. 324-7.
228. Houghton, P.J., et al., *Evaluation of cytarabine against Ewing sarcoma xenografts by the pediatric preclinical testing program*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(6): p. 1224-6.
229. Banerjee, A., et al., *Anticancer drug mithramycin interacts with core histones: An additional mode of action of the DNA groove binder*. FEBS Open Bio, 2014. **4**: p. 987-95.
230. Grohar, P.J., et al., *Identification of an Inhibitor of the EWS-FLI1 Oncogenic Transcription Factor by High-Throughput Screening*. Journal of the National Cancer Institute, 2011. **103**(12): p. 962-978.
231. Surdez, D., et al., *Targeting the EWSR1-FLI1 Oncogene-Induced Protein Kinase PKC- β Abolishes Ewing Sarcoma Growth*. Cancer Research, 2012. **72**(17): p. 4494-4503.
232. Engert, F., et al., *PARP Inhibitors Sensitize Ewing Sarcoma Cells to Temozolomide-Induced Apoptosis via the Mitochondrial Pathway*. Mol Cancer Ther, 2015.
233. Choy, E., et al., *Phase II study of olaparib in patients with refractory Ewing sarcoma following failure of standard chemotherapy*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 813.
234. Smith, M.A., et al., *Synergistic activity of PARP inhibition by talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(4): p. 819-32.
235. Dagher, R., et al., *Pilot trial of tumor-specific peptide vaccination and continuous infusion interleukin-2 in patients with recurrent Ewing sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma: an inter-institute NIH study*. Med Pediatr Oncol, 2002. **38**(3): p. 158-64.
236. Evans, C.H., et al., *EWS-FLI1-Targeted Cytotoxic T-cell Killing of Multiple Tumor Types Belonging to the Ewing Sarcoma Family of Tumors*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(19): p. 5341-5351.
237. O'Neill, A.F., et al., *Targeted Imaging of Ewing Sarcoma in Preclinical Models Using a ^{64}Cu -Labeled Anti-CD99 Antibody*. Clinical Cancer Research, 2014. **20**(3): p. 678-687.
238. Cheung, N.K., et al., *Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells*. Cancer Res, 1985. **45**(6): p. 2642-9.
239. Lipinski, M., et al., *Phenotypic characterization of Ewing sarcoma cell lines with monoclonal antibodies*. Journal of Cellular Biochemistry, 1986. **31**(4): p. 289-296.
240. Chang, H.R., et al., *Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas*. Cancer, 1992. **70**(3): p. 633-638.

241. Lammie, G., et al., *Ganglioside gd(2) expression in the human nervous-system and in neuroblastomas - an immunohistochemical study*. Int J Oncol, 1993. **3**(5): p. 909-15.
242. Ahmed, M. and N.-K.V. Cheung, *Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy*. FEBS Letters, 2014. **588**(2): p. 288-297.
243. Kailayangiri, S., et al., *The ganglioside antigen GD2 is surface-expressed in Ewing sarcoma and allows for MHC-independent immune targeting*. Br J Cancer, 2012. **106**(6): p. 1123-1133.
244. Yu, A.L., et al., *Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(14): p. 1324-1334.
245. Marini, P., et al., *Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo*. Oncogene, 2006. **25**(37): p. 5145-54.
246. Picarda, G., et al., *Preclinical Evidence that Use of TRAIL in Ewing's Sarcoma and Osteosarcoma Therapy Inhibits Tumor Growth, Prevents Osteolysis, and Increases Animal Survival*. Clinical Cancer Research, 2010. **16**(8): p. 2363-2374.
247. Wang, S., *The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway*. Oncogene, 2008. **27**(48): p. 6207-6215.
248. Merchant, M.S., et al., *Phase I Trial and Pharmacokinetic Study of Lexatumumab in Pediatric Patients With Solid Tumors*. Journal of Clinical Oncology, 2012. **30**(33): p. 4141-4147.
249. Smith, M.A., et al., *Initial Testing (Stage 1) of Mapatumumab (HGS-ETR1) by the Pediatric Preclinical Testing Program*. Pediatric blood & cancer, 2010. **54**(2): p. 307-310.
250. Jacobs, J.F., et al., *Cancer-germline gene expression in pediatric solid tumors using quantitative real-time PCR*. Int J Cancer, 2007. **120**(1): p. 67-74.
251. Lai, J.-P., et al., *NY-ESO-1 expression in synovial sarcoma and other mesenchymal tumors: significance for NY-ESO-1-based targeted therapy and differential diagnosis*. Mod Pathol, 2012. **25**(6): p. 854-858.
252. Krishnadas, D.K., et al., *A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(10): p. 1251-60.
253. Zhang, W., et al., *RACK1 Recruits STAT3 Specifically to Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors for Activation, Which Is Important for Regulating Anchorage-Independent Growth*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(2): p. 413-424.
254. Ruggiero, R.A., et al., *Concomitant Tumor Resistance: The Role of Tyrosine Isomers in the Mechanisms of Metastases Control*. Cancer Research, 2012. **72**(5): p. 1043-1050.
255. Lai, R., et al., *STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumours*. The Journal of Pathology, 2006. **208**(5): p. 624-632.
256. Jiang, Y., et al., *Germline PTPRD Mutations in Ewing Sarcoma: Biologic and Clinical Implications*. 2013. Vol. 4. 2013.
257. Sen, M., et al., *First-in-Human Trial of a STAT3 Decoy Oligonucleotide in Head and Neck Tumors: Implications for Cancer Therapy*. Cancer Discovery, 2012. **2**(8): p. 694-705.
258. Yan, S., Z. Li, and C.J. Thiele, *Inhibition of STAT3 with orally active JAK inhibitor, AZD1480, decreases tumor growth in Neuroblastoma and Pediatric Sarcomas In vitro and In vivo*. Oncotarget, 2013. **4**(3): p. 433-45.
259. Julien, S.G., et al., *Inside the human cancer tyrosine phosphatome*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 35-49.

260. Chandhanayingyong, C., et al., *MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions*. Sarcoma, 2012. **2012**: p. 404810.
261. Messerschmitt, P.J., et al., *Specific tyrosine kinase inhibitors regulate human osteosarcoma cells in vitro*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(9): p. 2168-75.
262. Montagut, C. and J. Settleman, *Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy*. Cancer Lett, 2009. **283**(2): p. 125-34.
263. Pratilas, C.A. and D.B. Solit, *Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(13): p. 3329-34.
264. Anderson, J.L., et al., *Evaluation of In Vitro Activity of the Class I PI3K Inhibitor Buparlisib (BKM120) in Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0133610.
265. Sampson, V.B., et al., *Vorinostat Enhances Cytotoxicity of SN-38 and Temozolomide in Ewing Sarcoma Cells and Activates STAT3/AKT/MAPK Pathways*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142704.
266. Unland, R., et al., *Suberoylanilide hydroxamic acid synergistically enhances the antitumor activity of etoposide in Ewing sarcoma cell lines*. Anticancer Drugs, 2015. **26**(8): p. 843-51.
267. Hensel, T., et al., *Targeting the EWS-ETS transcriptional program by BET bromodomain inhibition in Ewing sarcoma*. Oncotarget, 2015.
268. Maruyama, T., et al., *A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(18): p. 6509-20.
269. Dawson, M.A., et al., *Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia*. Nature, 2011. **478**(7370): p. 529-33.
270. Filippakopoulos, P., et al., *Selective inhibition of BET bromodomains*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1067-73.
271. Delmore, J.E., et al., *BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc*. Cell, 2011. **146**(6): p. 904-17.
272. Zuber, J., et al., *RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia*. Nature, 2011. **478**(7370): p. 524-8.
273. Puissant, A., et al., *Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition*. Cancer Discov, 2013. **3**(3): p. 308-23.
274. Wiegering, A., et al., *Targeting Translation Initiation Bypasses Signaling Crosstalk Mechanisms That Maintain High MYC Levels in Colorectal Cancer*. Cancer Discov, 2015. **5**(7): p. 768-81.
275. Kovar, H., *Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2014. **18**(11): p. 1315-28.
276. Giorgi, C., et al., *PI3K/AKT signaling modulates transcriptional expression of EWS/FLI1 through specificity protein 1*. Oncotarget, 2015. **6**(30): p. 28895-910.
277. Huang, W. and K. Zou, *Cytotoxicity of the saponin TTB2 on Ewing sarcoma cells*. Exp Ther Med, 2015. **10**(2): p. 625-628.
278. Mizukami, Y., Y. Kohgo, and D.C. Chung, *Hypoxia Inducible Factor-1–Independent Pathways in Tumor Angiogenesis*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(19): p. 5670-5674.
279. Jung, Y.J., et al., *IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis*. Faseb j, 2003. **17**(14): p. 2115-7.

280. Lipskar, A.M., et al., *Cyclooxygenase 2 mediates the antiangiogenic effect of rapamycin in Ewing sarcoma*. J Pediatr Surg, 2009. **44**(6): p. 1139-46; discussion 1146-7.
281. Barlow, M., et al., *Celecoxib inhibits invasion and metastasis via a cyclooxygenase 2-independent mechanism in an in vitro model of Ewing sarcoma*. J Pediatr Surg, 2012. **47**(6): p. 1223-7.
282. Gendy, A.S., et al., *Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses metastatic disease without affecting primary tumor growth in a murine model of Ewing sarcoma*. J Pediatr Surg, 2011. **46**(1): p. 108-14.
283. Behr, C.A., et al., *Celecoxib inhibits Ewing sarcoma cell migration via actin modulation*. J Surg Res, 2015. **198**(2): p. 424-33.
284. Felgenhauer, J.L., et al., *A Pilot Study of Low-Dose Anti-angiogenic Chemotherapy in Combination with Standard Multiagent Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed Metastatic Ewing Sarcoma Family of Tumors: A Children's Oncology Group (COG) Phase II Study*. Pediatric blood & cancer, 2013. **60**(3): p. 409-414.